Andréa Ático Monteiro Gadelha

Avaliação do Desempenho do "Kit" EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos Frente ao ELISA Convencional e ao Teste de Hemaglutinação Indireta

Dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/MS para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientadores: Yara de Miranda Gomes, BSc, MSc, PhD

Wayner Vieira Souza, MSc

Recife/2003

G124a

Gadelha, Andréa Ático Monteiro
Avaliação do desempenho do “Kit” EIE - Recombinante – Chagas – Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e ao teste de hemaglutinação indireta/ Andréa Ático Monteiro Gadelha, orientadores: Yara de Miranda Gomes e Wayner Vieira de Souza.
56 f. : il., tabs., figs.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – NESC/CPqAM/FIOCRUZ.
Inclui referências bibliográficas e anexos.

1.Doença de Chagas. 2.Diagnóstico. 3.Antígenos recombinantes. I. Gomes, Yara de Miranda. II.Souza, Wayner Vieira de (orients.). III. Título

CDU 616.937 Biblio/CPqAM

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu marido, Gonzaga Júnior e ao meu filho, Gabriel, por todo amor, estimulo e dedicação na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Roberto e Anita, sem os quais talvez nem tivesse tido a oportunidade de estar concluindo este curso de pós-graduação.

À minha filha, Catharina, que estará chegando ao mundo numa fase muito especial da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade que Ele estava me oferecendo.

À Dra. Yara de Miranda Gomes, Pesquisadora Titular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM/FIOCRUZ, que a tive não só como orientadora, mas também como uma grande amiga, e através dela pude aprender o significado de valores como dedicação, profissionalismo, competência e compreensão.

Ao Prof. Wayner Vieira de Souza, Pesquisador do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM/FIOCRUZ, pela orientação na área de estatística.

Ao Dr. Rômulo Maciel Filho, Diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde o trabalho de tese foi realizado.

Ao Prof. Dr. Eduardo Freese, Diretor de Ensino do CPqAM, pela dedicação e atenção dispensada no decorrer do presente trabalho.

Ao Dr. Frederico G. C. Abath, Chefe do Departamento de Imunologia do CPqAM, pela atenção que me foi dada durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, pela colaboração e sugestões durante a realização do presente trabalho.

Ao Dr. Antônio P. G. Ferreira, Chefe do Laboratório de Reativos de Biomanguinhos, pelo fornecimento do “kit” EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos utilizado nesta tese.

Às amigas Alinne Verçosa, Virginia Lorena e Valéria Pereira, pelo apoio, ajuda e principalmente amizade nas horas difíceis.

A Mineo Nakazawa pelo apoio técnico na realização dos testes, e acima de tudo, pela amizade desenvolvida no decorrer do trabalho.

À Dra. Maria de Fátima Sampaio Gadelha, Diretora Executiva de Captação, Processamento e Dispensação de Sangue da Fundação HEMOPE, pela ajuda, incentivo e confiança depositada em mim durante o período desta pesquisa.

À Betânia, Genilda e Lucília, da Fundação HEMOPE, pela colaboração na doação de soros contendo anticorpos contra doenças infecciosas, utilizados neste trabalho.

A todos os que fazem o Departamento de Imunologia do CPqAM, pelos incentivos recebidos.

A Paulo Lira, da Secretaria Acadêmica do NESC/CPqAM, pela atenção que me foi dispensada durante a realização do presente trabalho.

Aos bibliotecários do CPqAM, Romero E. da Silva, Virgínia Guimarães e Luciana Abrantes, pela ajuda na obtenção das referências bibliográficas.

À Dra. Otamires Alves da Silva, Odair Vieira da Silva e Petronildo B. da Silva, pela realização da sorologia para Leishmaniose.

Ao Dr. Wilson de Oliveira Júnior, pela ajuda e atenção que me foram dispensadas no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, durante a coleta de dados.

Às Dras. Maria das Neves Barros (Nevinha) e Maria da Glória Melo, pela paciência e atenção que me foram dispensadas no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Oswaldo Cruz.

À Valdinete Paiva (Val) e Ana Lúcia Vicente da Silva, verdadeiros anjos que trabalham no Ambulatório de Doença de Chagas, pela atenção e carinho.

À amiga Andrea Silva, pela ajuda na captação dos controles.

Aos indivíduos categorizados como controles e casos, que concordaram em participar desta pesquisa.

Aos colegas de Mestrado, pela convivência e amizade firmada a partir dos momentos que passamos juntos.

À todas as pessoas que me apoiaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pelo apoio financeiro.

Ao laboratório Biolab pela doação dos conjuntos diagnósticos dos testes de hemaglutinação indireta, necessários para a realização do trabalho.

À Norclínicas, pelo imprescindível apoio oferecido durante a coleta dos controles.

À você, que provavelmente eu possa ter esquecido, muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

CO	Cut-off
CRA	“Cytoplasmic repetitive antigen”
DO	Densidade óptica
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
F	Feminino
UPE	Universidade de Pernambuco
DAT	Teste de aglutinação direta
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
CCS	Centro de Ciências da Saúde
WHO	World Health Organization
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
HEMOPE	Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
MS	Ministério da Saúde
LC	Leishmaniose cutânea
HIV	Vírus da Imunideficiência Humana
HCV	Vírus da hepatite C
SIF	Sífilis
HC	Hospital das Clínicas
FC	Forma cardíaca
FCA	Forma cardíaca assintomática

FD	Forma digestiva
FM	Forma mista
FRA	“Flagelar repetitive antigen”
HAI	Hemaglutinação indireta
I	Inconclusivo
IFI	Imunofluorescência indireta
kDa	Quilodalton
M	Masculino
NR	Não-reagente
NRT	Soro não-retestado
OMS	Organização mundial da saúde
QL	Qualitativo
QT	Quantitativo
R	Reagente
RT	Retestagem
TESA	Antígeno excretório-secretório de tripomastigotas

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Métodos parasitológicos utilizados na doença de Chagas 4

Tabela 2 - Variações encontradas nos componentes do ELISA 9

Tabela 3 - Dados demográficos dos indivíduos não-chagásicos 27

Tabela 4- Dados demográficos dos indivíduos chagásicos 32

Tabela 5- Combinação binária entre os resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença..... 40

Tabela 6 - Performance do diagnóstico da doença de Chagas através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste HAI..... 43

Tabela 7 - Comparação da reatividade do ELISA-Rec, do ELISA-Con e do teste de HAI..... 44

Tabela 8 - Amostras representativas dos resultados falso-negativos obtidos através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de HAI..... 45

Tabela 9 - Comparação da reatividade dos soros de indivíduos portadoresde outras doenças infecciosas e parasitárias através do ELISA-Rec e dos métodos sorológicos convencionais..... 46

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em Laboratórios de Saúde Pública 17

Figura 2 - Triagem sorológica de doadores de sangue para a Infecção pelo *T. cruzi* 18

Figura 3 - Testes de hemaglutinação indireta 19

Figura 4 - Reação de imunofluorescência indireta 20

Figura 5 - Representação esquemática da reação que ocorre no ELISA convencional 21

Figura 6 - Localização celular dos antígenos CRA e FRA 22

Figura 7 - Representação esquemática do ELISA direto utilizado no kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos 23

Figura 8 - Densidade óptica das amostras analisadas através do ELISA-Con 47

Figura 9 - Densidade óptica das amostras analisadas através do ELISA-Rec 48

RESUMO

Um ELISA recombinante (EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos), ELISA-Rec, desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz, foi comparado com ELISA convencional (ELISA-Con) e com o teste de Hemaglutinação indireta (HAI) para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, visando estabelecer a combinação de dois testes que pudessem reduzir o número de resultados indeterminados ou inconclusivos. A avaliação foi realizada com 287 amostras: 112 de pacientes chagásicos, 143 de indivíduos não chagásicos e 32 de indivíduos com outras doenças infecto-parasitárias – sífilis (n=11), vírus da hepatite C -HCV (n=7), vírus da imunodeficiência humana -HIV (n=9) e leishmaniose cutânea –LC (n=5). A análise sorológica dos 112 pacientes chagásicos através do teste de HAI, mostrou os seguintes resultados: 59 reagentes, 13 não-reagentes (falso-negativos) e 40 inconclusivos. Cada ELISA identificou 110 dos 112 pacientes chagásicos e nenhum resultado inconclusivo foi observado. Os dois resultados falso-negativos detectados pelos ELISAs foram obtidos de diferentes pacientes chagásicos. Todos os métodos utilizados apresentaram 100% de especificidade. A sensibilidade ELISA-Rec e ELISA-Con foi 98,2% (IC 95%: 93,1-99,7%), enquanto a sensibilidade do teste de HAI foi 52,7% (IC 95%: 43,1-62,1%). Quando nós avaliamos os resultados pela combinação do ELISA-Rec e o testes de HAI, 52 resultados inconclusivos e 1 falso-negativo foram obtidos. Resultados similares foram obtidos quando nós combinamos o ELISA-Con e o teste de HAI, 2 e 51 pacientes apresentaram resultados falso-negativos e inconclusivos, respectivamente. Por outro lado, quando a combinação foi realizada com o ELISA-Rec e o ELISA-Con, o número

de resultados inconclusivos foi reduzido para 4. Nenhuma reação cruzada foi observada quando testamos os soros de indivíduos portadores de outras parasitoses através do ELISA-Rec e do ELISA-Con, todos os resultados foram não-reagentes. Porém, reações cruzadas foram observadas quando testamos com o HAI (sífilis =1, HCV =1, LC = 2). Estes resultados indicam que a combinação de dois ELISAs com preparações antigênicas diferentes, no caso o ELISA-Rec e o ELISA-Con, concorre para: 1) a diminuição de resultados falso-negativos, que em banco de sangue levam à transfusão de sangue contaminado; 2) a diminuição de resultados inconclusivos que minimizam as etapas de retestagens e conseqüentemente custos obtidos destas retestagens; 3) a diminuição de resultados falso-positivos causando um grave problema social; 4) a automação, que concorre para a obtenção de resultados mais seguros e mais rápidos.

ABSTRACT

A recombinant ELISA (EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos), Rec-ELISA, developed by the Oswaldo Cruz Foundation, was compared with both the conventional ELISA (Con-ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) test, for the detection of antibodies against *T. cruzi*, in order to establish a combination of two tests that can reduce the number of inderterminate or inconclusive results. Evaluation was performed with 287 serum samples: 112 samples from chagasic patients, 143 from nonchagasic individuals and 32 from patients with other parasitic and infectious diseases –syphilis (n=11), hepatitis C virus -HCV (n=7), human immunodeficient virus -HIV (n=9) and cutaneous leishmaniasis –CL (n=5). The serological analysis of 112 chagasic patients by IHA showed the following results: 59 reactive, 13 non-rective (false-negative) and 40 inconclusive. Both ELISAs recognized 110 of 112 chagasic patients and no inconclusive results were observed. The two false-negative results detected by ELISAs were obtained from different chagasic patients. All the methods used showed 100% of specificity. The sensitivity of the Rec-ELISA and Con-ELISA was 98.2% (CI 95%: 93.1-99.7%), while the sensitivity of the IHA test was 52.7% (CI 95%: 43.1 – 62.1%). When we evaluated the results by matching the Rec-ELISA and IHA test, 52 inconclusive and 1 false-negative results were obtained. Similar results were obtained when we matched Con-ELISA and IHA test, 2 and 51 patients showed false-negatives and inconclusive results, respectively. On the other hand, when we matched the Rec-ELISA and Con-ELISA only 4 inconclusive results were observed. No cross-reactions were observed when sera from patients with other parasitic and infectious diseases were tested by Rec-ELISA and Con-ELISA. However, cross-

reactions were detected when these patients were tested by IHA (syphilis=1, HCV=1, CL= 2). Take together, these results indicate that the use of two enzyme immunoassays with differents antigens preparations, as the Rec-ELISA and Con-ELISA concurs to: 1) reduction of false-negative results, that in blood bank led to transfusion of contaminated blood; 2) reduction of inconclusive results that decrease the number of tests and also their cost; 3) reduction of cross-reactions that can create social problems; 4) safer and faster results, that can be obtained by automation.

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas.....	1
1.2 . Métodos imunológicos.....	5
1.2.1. Teste de Hemaglutinação Indireta (HAI).....	6
1.2.2. Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI).....	7
1.2.3. Teste Imunoenzimático ELISA.....	8
1.3. Padronização dos testes sorológicos convencionais.....	9
1.4. Utilização de diferentes antígenos nos testes sorológicos.....	11
1.4.1. Antígenos purificados.....	11
1.4.2. Antígenos excretórios-secretórios.....	11
1.4.3. Antígenos recombinantes.....	12
1.4.4. Peptídeos sintéticos.....	15
2. Objetivos.....	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específico.....	16
3. Casuística e Métodos.....	24
3.1. Local de coleta das amostras.....	24
3.2. Amostra do estudo.....	25
3.2.1. Definição de casos e controles.....	25
3.2.2. Dimensionamento da amostra.....	26
3.3. Amostras coletadas.....	37
3.4. Processamento das amostras.....	37

3.5. Análise estatística..... 39
4. Resultados..... 41
5. Discussão..... 49
5.1. O desempenho do ELISA-Rec..... 50
5.2. A Problemática do teste de HAI..... 52
5.3. Valor de comercialização do "kits"..... 53
5.4. Problemas metodológicos..... 54
6. Conclusões..... 55
7. Recomendação..... 56
8. Referências Bibliográficas..... 57
9. Anexos..... 61
Anexo 1 - Consentimento informado..... 62
Anexo 2 - Questionário..... 63
Anexo 3 - Parecer da Comissão de Ética do CPqAM/FIOCRUZ..... 65
Anexo 4 - Avaliação sorológica dos indivíduos chagásicos (casos) através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de 66
Anexo 5 - Avaliação sorológica dos indivíduos não-chagásicos (controles) através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de HAI..... 69
Anexo 6 - Prêmio Edmundo Chapadeiro..... 73
Anexo 7 - Resumo publicado nos Anais da Jornada de Pós-Graduação da FIOCRUZ, 2001..... 74
Anexo 8 - Resumo publicado na Rev Soc Bras Med Trop, 2001..... 75
Anexo 9 - Resumo publicado nos Anais da XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2002..... 77
Anexo 10 – Certificado de participação na XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e VI Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, como apresentadora do trabalho, na forma de "poster", "Diagnóstico da doença de Chagas: análise comparativa dos ELISAs recombinante e convencional com o teste de hemaglutinação"..... 79

1. Introdução

1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é circunscrita à América Latina, onde se estima que a prevalência da infecção humana em 15 países endêmicos é cerca de 18 milhões de casos e que aproximadamente 40 milhões de pessoas estão sob o risco da infecção (WHO, 2002).

A doença, que apresenta uma fase aguda e uma fase crônica, é transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae, vulgarmente conhecidos pelo nome de "barbeiros" (WHO, 1996). A transmissão também pode ocorrer sem a intervenção do vetor, por via transfusional, congênita, oral e por transplantes de órgãos contaminados.

Clinicamente, a doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda e uma fase crônica (AMATO NETO et al., 1997; ANDRADE, 2000).

A fase aguda, quando sintomática, surge após 7 a 10 dias da infecção pelo *T. cruzi*. É reconhecida pela presença de parasitas no sangue e por sintomas como: febre, adenopatias, hepato-esplenomegalia, sinais e sintomas de miocardite e meningoencefalite, edema localizado ou generalizado e por sinais de porta de entrada do parasita. Se a infecção é na mucosa conjuntival, se observa um edema unilateral bipalpebral conhecido como sinal de Romaña. Se a infecção é cutânea, um chagoma de inoculação pode ser observado.

A fase crônica caracteriza-se pela escassez de parasitas no sangue. Essa fase é reconhecida pelo acometimento do coração (forma cardíaca), do tubo digestivo (forma digestiva) e do sistema nervoso (forma nervosa), ou por apenas um diagnóstico sorológico positivo para a doença de Chagas (forma indeterminada).

A forma cardíaca é responsável por um maior número de óbitos da doença e é caracterizada por uma síndrome de insuficiência cardíaca congestiva, predominantemente arrítmica, onde a morte súbita pode ser a primeira manifestação. Do ponto de vista eletrocardiográfico, o bloqueio de ramo direito associado a extra-sístoles são as alterações mais freqüentes. Patologicamente, o aneurisma apical do ventrículo esquerdo é a lesão característica da doença (ANDRADE, 1996).

A forma digestiva da doença é caracterizada pela dilatação de vísceras ocas, principalmente, o esôfago e cólon. Comumente “os megas” se manifestam por disfagia (megaesôfago) e constipação (megacólon).

Na forma indeterminada da fase crônica os indivíduos chagásicos são assintomáticos, com eletrocardiograma e estudo radiológico do coração, esôfago e cólons normais, mas a sorologia é positiva. Esta forma tem particular interesse médico-social e trabalhista pelo fato de indivíduos chagásicos, assintomáticos e em plena faixa produtiva da vida serem excluídos do mercado de trabalho (OLIVEIRA JR., 1991).

Até o presente momento, não existe um medicamento eficaz para o tratamento ou para a prevenção da doença. Os tradicionais antiparasitários, Nifurtimox e Benzonidazol, são parcialmente eficazes apenas na fase aguda da infecção (CANÇADO, 1985). Além disso, a sua ação depende do tipo de cepa que produziu a infecção (ANDRADE et al., 1989). A prevenção da doença é feita pelo controle de vetores, triagem de sangue parasitado nos serviços de hemoterapia e educação sanitária.

Na fase aguda, cerca de dois meses, o diagnóstico etiológico é baseado na detecção do parasita através de métodos parasitológicos diretos (Tabela 1). Na fase crônica, o diagnóstico laboratorial torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia. Nessa fase, o diagnóstico pode ser realizado por métodos parasitológicos

indiretos (xenodiagnóstico ou hemocultura) que apresentam baixa sensibilidade (20-50%) (Tabela 1) em indivíduos sabidamente infectados, resultando em vários resultados falso-negativos (GOMES, 1997).

O diagnóstico seguro nessa fase é importante do ponto de vista individual e também por razões epidemiológicas, uma vez que a transmissão do *T. cruzi* por transfusão de sangue, doado por indivíduo assintomático, é um dos principais problemas de saúde pública nos países onde a doença é endêmica. Entretanto, o diagnóstico sorológico seguro não é fácil, particularmente na forma crônica assintomática da infecção durante a qual resultados contraditórios provenientes de diferentes laboratórios, têm sido observados. A razão para esses resultados discrepantes parece estar relacionada com o tipo de antígeno empregado nos testes imunológicos (extrato bruto ou semi-purificado do parasita) (GOMES, 1997).

Uma breve revisão dos métodos imunológicos utilizados para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, na fase crônica da doença será apresentada no item 2.

Tabela 1 – Métodos parasitológicos utilizados na doença de Chagas (WHO, 1991)

Métodos	Tipo de laboratório*	Sensibilidade** (%)	
		F. aguda	F. crônica
Diretos			
Esfregaços	A/B	< 60	< 10
Gota espessa	A/B	< 70	< 10
Exame de sangue a fresco	A/B	80-90	< 10
Método de Strout	A/B	90-100	< 10
Indiretos			
Xenodiagnóstico	B	100	20-50
Hemocultura	B	100	20-50

* A = Laboratórios de centros de saúde localizados em área de risco de transmissão vetorial e não-vetorial; B = Laboratórios especializados para diagnóstico parasitológico.

** Sensibilidade comparada ao xenodiagnóstico na fase aguda da infecção e ao diagnóstico sorológico na fase crônica.

1.2. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos são importantes na doença de Chagas não só pela facilidade de execução como também por fornecerem resultados em prazos curtos, diferentemente dos métodos parasitológicos já mencionados. Eles têm sua maior indicação na fase crônica da infecção contribuindo para: 1) fazer diagnósticos individuais; 2) levantar níveis de endemicidade; 3) avaliar medidas de controle de transmissão; 4) selecionar doadores de sangue; 5) avaliar atividades de drogas; e 6) acompanhar as respostas imunes (GOMES, 1996). Esses métodos se baseiam na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* de isotipo IgG que se liga especificamente a antígenos do parasita.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), para um diagnóstico sorológico confiável é necessário obter resultados concordantes em pelo menos dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes (LUQUETTI & RASSI, 2000) seguindo os fluxogramas para diagnóstico sorológico (Fig. 1) e para triagem sorológica em banco de sangue (Fig. 2). Os métodos sorológicos atualmente mais empregados para o diagnóstico da infecção crônica bem como para triagem de doadores em banco de sangue são a imunofluorescência indireta-IFI, hemaglutinação indireta-HAI e Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA. Estes testes são suficientemente aprovados, com desempenho conhecido, sendo por isso chamados de “testes convencionais” em contraposição a novos testes ditos “não convencionais”, propostos por diferentes pesquisadores, que necessitam ainda da aprovação ampla dos usuários (LUQUETTI & RASSI, 2000).

1.2.1. Teste Hemaglutinação Indireta (HAI)

O teste de HAI se baseia na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasita (Fig. 3A). O teste é constituído de 3 etapas. Na etapa 1 adiciona-se a amostra, que, sendo reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi*. O suporte é uma placa de microtitulação com 96 cavidades ou em tiras de 8 ou 12 cavidades. Na etapa 2, adiciona-se hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*. A reação antígeno-anticorpo (etapa 3) é visualizada pela aglutinação das hemácias (BRASIL, 1998).

A leitura é feita a olho nu, com a placa de microtitulação colocada contra a luz ou em espelho próprio. A amostra é considerada reagente quando as hemácias estão distribuídas de maneira homogênea, em forma de tapete ou manto, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa; não reagente quando as hemácias ficam acumuladas em forma de botão no fundo do poço; e é considerada indeterminada quando apresenta qualquer padrão diferente dos anteriores (Fig. 3B) (BRASIL, 1998).

O teste de HAI pode ser qualitativo ou quantitativo. O teste de HAI qualitativo é utilizado para definir se uma amostra é reagente ou não reagente. Nesse caso a amostra é diluída apenas uma vez. O teste de HAI quantitativo é utilizado para confirmar os resultados das amostras reagentes no HAI qualitativo e para definir o título destas amostras. Para a titulação é feita a diluição seriada do soro. A execução do teste deve ser feita de acordo com o fabricante.

Essa técnica tem sido amplamente utilizada para fins de rotina em virtude do baixo custo e simplicidade na sua execução. No entanto, reações cruzadas têm sido observadas com outras parasitoses, principalmente com leishmanioses. Além disso, a leitura é subjetiva o que concorre para falhas na interpretação dos resultados.

1.2.2. Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O teste de IFI se baseia na interação do próprio *T. cruzi* (formas epimastigotas formolizadas) com os anticorpos contra esse parasita presentes no soro. Como mostra a Fig. 4A, na etapa 1 o parasita é fixado numa lâmina de vidro com regiões demarcadas; na etapa 2 é adicionada a amostra diluída que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam ao antígeno *T. cruzi*; na etapa 3, adiciona-se o conjugado composto de uma anti-imunoglobulina humana ligada ao isotiocianato de fluoresceína, que servirá como revelador da reação antígeno-anticorpo. A interação antígeno-anticorpo é evidenciada por meio da fluorescência do parasita na etapa 4 (BRASIL, 1998).

A leitura é realizada através de um microscópio de fluorescência e a interpretação dos resultados deve obedecer aos critérios descritos abaixo.

Amostra reagente: presença de fluorescência uniforme em todas as membranas do tripanosoma. Amostra não reagente: Ausência total de fluorescência nos tripanosomas (Fig. 4B). Amostra indeterminada: Qualquer padrão diferente dos descritos acima.

Assim como o teste de HAI, o teste de IFI pode ser qualitativo ou quantitativo. O IFI qualitativo define se a amostra é reagente, não reagente ou indeterminada. O IFI quantitativo confirma os resultados das amostras reagentes e indeterminadas no IFI qualitativo e define o título das amostras reagentes. A execução do teste é feita de acordo com o fabricante.

O amplo emprego do teste de IFI se deve as seguintes vantagens: 1. relativa facilidade de se obter reagentes padronizados; 2. elevada sensibilidade e 3. processamento de um grande número de amostra. Contudo, a leitura á subjetiva

principalmente nos casos “borderline” e sua especificidade é baixa já que favorece a reações cruzadas com outras parasitoses em baixos títulos.

1.2.3. Teste imunoenzimático ELISA

O teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos contra *T. cruzi* foi estabelecido por VOLLER *et al*. (1975). Nesta técnica a presença de anticorpos contra o parasita é revelada através de anticorpos anti-imunoglobulina ligados a uma enzima, que na presença do seu substrato forma um produto colorido. O tipo de ELISA é o indireto e é realizado em uma placa de microtitulação de 96 poços. A sequência para seu desenvolvimento é mostrada na Fig. 5. A Tabela 2 mostra as variações encontradas nos componentes do ELISA para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

No ELISA o resultado de uma reação é definido pela leitura da absorbância ou densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda indicado pelo fabricante. Cada conjunto tem a sua forma de calcular o “cut-off” (CO), ou seja, o seu ponto de corte, acima ou abaixo do qual as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas.

As amostras indeterminadas são aquelas cujos valores de DO estão incluídos na zona cinza (“borderline”). A zona cinza compreende a faixa de valores em torno do CO, dentro da qual não se pode ter certeza do resultado.

Algumas das vantagens do ELISA são: a elevada sensibilidade; a utilização de pequeníssimas quantidades de soro ou plasma; a facilidade de pré-sensibilizar as placas com antígeno e congelá-las a –20°C até o momento de sua utilização; o processamento de várias amostras em uma só placa; e a utilização de espectrofotômetros portáteis para

a leitura dos resultados no campo (GOMES, 1996). Por outro lado, sua especificidade está longe do ideal se antígenos brutos ou semi-purificados são utilizados, principalmente pela presença de resultados "borderline" (GOMES, 1996).

O desempenho dos diferentes "kits" (conjuntos diagnósticos) existentes no mercado foi avaliado obtendo-se sensibilidade de 97 a 100% e especificidade de 93 a 100%, sendo constante nos diferentes estudos a elevada sensibilidade com especificidade variável.

Tabela 2 – Variações encontradas nos componentes do ELISA

COMPONENTES	ELISA
Fase sólida	* placas de microtitulação – produzidas, geralmente, em poliestireno transparente com 96 cavidades, com fundo chato ou arredondado * pérolas – pequenas esferas de poliestireno
Antígeno	* frações isoladas do parasita *T. cruzi*, preparadas para reduzir a possibilidade de reação cruzada
Enzima	* fosfatase alcalina ou peroxidase
Substrato	* peróxido de hidrogênio
Cromógenos	* ortofenilenodiamina (OPD) ou tetrametil benzidina (TMB)
Solução de bloqueio	* ácido sulfúrico ou ácido clorídrico

Fonte: BRASIL, 1998.

1.3. Padronização dos testes sorológicos convencionais

Face à diversidade de reagentes utilizados, assim como as diferenças nos procedimentos técnicos houve relato de disparidade de resultados entre os laboratórios, o que levou a certo descrédito da sorologia convencional particularmente do teste de

HAI (LUQUETTI & RASSI, 2000). Esses resultados discordantes também poderiam ser devido a falhas na execução dos diferentes protocolos, bem como resultados falso-positivos em virtude de determinantes antigênicos comuns entre o *T. cruzi* e outros parasitas, particularmente *Leishmania*.

Com o objetivo de abolir as falhas na execução dos protocolos, o Ministério da Saúde através do programa de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e AIDS e da Coordenação de Sangue e Hemoderivados (COSAH), elaborou um manual e um vídeo da série Telelab destinado a técnicos que realizam os testes sorológicos, de abrangência nacional. Esse treinamento "à distância" tem permitido um melhor desempenho dos técnicos na obtenção de resultados de elevada confiabilidade (LUQUETTI & RASSI, 2000).

Para tentar solucionar o problema dos resultados falso-positivos, vários grupos de pesquisa têm utilizado antígenos purificados, recombinantes ou sintéticos os quais têm demonstrado maior confiabilidade nos testes sorológicos (GOLDENBERG *et al.*, 1991, KRIEGER *et al.*, 1992, UMEZAWA *et al.*, 1999, GOMES *et al.*, 2001, SILVA *et. al.*, 2002). Estes antígenos devem atender alguns critérios: 1) estarem presentes em isolados de *T. cruzi* de diferentes áreas endêmicas e ausente em outros agentes infecciosos; 2) serem imunogênicos em populações com diferentes "background genético" independente da fase clínica da doença de Chagas; 3) serem estáveis; 4) serem de fácil obtenção (ZINGALES *et al.*, 1990, STOLF, 1992).

1.4. Utilização de diferentes antígenos nos testes sorológicos

1.4.1. Antígenos purificados

Na década de 80 surgiram vários antígenos purificados com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes. Os antígenos purificados - GP90 kDa presentes na superfície de todos os estágios evolutivos do *T. cruzi* (SCOTT & SNARY, 1982), GP57/51 kDa presente na superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos (SCHARFSTEIN *et al*., 1986), GP97-83 presente nos estágios amastigota e epimastigota (PAN & PRATT, 1989) - foram usados em pesquisa com bons resultados elevando a especificidade das reações. No entanto, não foram incluídos em "kits" por razões econômicas e técnicas. A purificação e produção de antígenos do parasita pela bioquímica clássica é uma tarefa muito difícil e longa e, apenas pequeníssimas quantidades dos componentes antigênicos são obtidas.

1.4.2. Antígenos excretórios-secretórios

"Immunoblot" utilizando TESA (antígenos excretório-secretório de tripomastigotas) de *T. cruzi* da cepa Y, TESA-blot, foi proposto como um método sensível e específico nos casos de infecção pelo *T. cruzi* congênita ou aguda ou como um teste confirmatório para a sorologia convencional da doença de Chagas (UMEZAWA *et al.* 1996). No TESA-blot, utilizando a cepa Y, soros de pacientes chagásicos nas formas aguda e congênita reagem com bandas ("ladder-like") de 130 a 200 kDa, sendo reconhecidos por anticorpos da classe IgM e IgG. Soros de pacientes chagásicos na forma crônica reagem com uma banda larga de 150 a 160 kDa sendo reconhecidos por anticorpos da classe IgG. Recentemente, NAKAZAWA *et al*. (2001) mostraram que o soro de 100% dos pacientes chagásicos crônicos identificaram uma

banda de 150-170 kDa no TESA outras cepas de *T. cruzi* (WSL, SF e Colombiana), apesar de reações cruzadas ocorrerem com bandas inferiores a 150-170 kDa principalmente com leihshmaniose visceral e cutânea. Além disso, como o formato "immunoblot" não é muito apropriado para testar um grande número amostras, esses autores propuseram utilizar o TESA no formato ELISA (TESA-ELISA) devido a sua simplicidade, facilidade de execução e além disso dispõe de automação. Os resultados mostraram 100% de sensibilidade e 96% de especificidade (ABATH *et al*., 2000; NAKAZWA *et al*., 2001), o que era esperado devido à reatividade cruzada com antígenos de baixo peso molecular no TESA-blot com soro de pacientes portadores de leishmanioses. Para verificar essa hipótese, esses autores realizaram um estudo preliminar onde purificaram através de eletroforese preparativa a banda de 150-170 kDa usando o TESA da cepa Y. A fração obtida de 150-170 kDa foi avaliada pelo ELISA utilizando-se soro de pacientes chagásicos crônicos. A especificidade e sensibilidade foram de 100% (NAKAZWA *et al*., 2001). A fração de 150-170 kDa do TESA é potencialmente relevante para o diagnóstico da doença de Chagas e necesssita de investigações adicionais.

1.4.3. Antígenos recombinantes

Na última década, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, os problemas relacionados à purificação de proteínas pela bioquímica clássica foram superados. Com a tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível a expressão e produção em bactérias, ou em outro microrganismo conveniente, de proteínas heterólogas. O procedimento básico consiste em introduzir em bactérias o material genético (DNA) de outro organismo de tal forma que as bactérias agora "transformadas"

processarão este DNA como seu próprio material genético. Dessa maneira, a partir deste DNA exógeno introduzido nas bactérias, as mesmas produzirão “proteínas recombinantes”.

Através de manipulações adequadas, bactérias foram transformadas com o material genético do *T. cruzi*, sendo gerada uma biblioteca de genes do parasita em bactérias, obtendo-se clones de bactérias expressando diferentes genes do parasita causador da doença de Chagas. Para detectar clones de bactérias que estavam expressando antígenos parasitários com valor diagnóstico, a biblioteca foi varrida, através do uso de técnicas imunológicas apropriadas, com soro de pacientes chagásicos, de tal forma que foram detectados diversos clones de bactérias que estavam produzindo proteínas do *T. cruzi,* que foram reconhecidas pelo soro dos pacientes chagásicos (LAFAILLE et al., 1989). Após a análise individual desses clones frente a sua reatividade com soros negativos e positivos para a doença de Chagas, dois clones que estavam expressando proteínas do *T. cruzi* com elevado valor de diagnóstico foram isolados. O estudo posterior destes genes revelou que ambos apresentavam uma estrutura onde havia a repetição de um mesmo motivo (epítopo) reconhecido por anticorpo. Um dos antígenos apresentava uma localização difusa no citoplasma enquanto o outro era flagelar. Em função de sua estrutura em epitopos repetitivos e sua localização, esses antígenos foram denominados de CRA (“cytoplasmic repetitive antigen” ou antígeno citoplasmático repetitivo) e está presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e FRA (“flagelar repetitive antigen” ou antígeno flagelar repetitivo), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (Fig. 6) (LAFAILLE et al., 1989).

Estudos posteriores demonstraram que estes genes são altamente polimórficos (KRIEGER et al., 1990). No entanto apesar de polimórficos em diferentes cepas, estes antígenos foram reconhecidos por mais de 95% dos soros chagásicos quando individualmente testados por radioimunoensaio, indicando que os determinantes antigênicos são bem conservados (GOLDENBERG et al., 1991). Estes antígenos revelaram-se importantes no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, quando testados em conjunto pelo método ELISA, uma vez que a sensibilidade e especificidade foi de 100% (KRIEGER et al., 1992).

Esses antígenos foram desenvolvidos pelo grupo do Dr. Samuel Goldenberg do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/FIOCRUZ e atualmente são produzidos na forma de "kit" de diagnóstico (EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos®) por Bio-Manguinhos, uma das Unidades da FIOCRUZ, que detém a patente do mesmo no Brasil (BR PT 1100553-0), nos Estados Unidos (US 5736348) e na Europa (919203356.2). O "kit" EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos utiliza como método o ELISA direto (Fig. 7). Estudos recentes sobre o diagnóstico sorológico utilizando o referido kit em população de área endêmica para doença de Chagas mostrou a excelente performance do kit apresentando 100% de especificidade e sensibilidade (GOMES et al., 2001). Associadas à elevada especificidade e sensibilidade algumas vantagens do EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos devem ser ressaltadas como: (i) a utilização de antígenos recombinantes específicos de *T. cruzi* evitam reações falso-positivas; (ii) o ELISA direto aumenta a sensibilidade do método permitindo a avaliação de soro com baixo título, e corrobora sua especificidade; (iii) a utilização de amostras de soro não diluídas reduz a possibilidade de erro devido à manipulação; (iv) o procedimento é rápido (2 horas), fácil de realizar e de baixo custo.

A avaliação do referido “kit” está sendo realizada pelo Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ onde o presente trabalho foi desenvolvido.

Outros antígenos recombinantes têm sido propostos para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* (UMEZAWA et al., 1999, SILVEIRA *et al*., 2001). No entanto, a sua utilização limita-se ainda a estudos laboratoriais.

1.4.4. Peptídeos sintéticos

A partir dos antígenos recombinantes, foram produzidos peptídeos sintéticos, moléculas de tamanho menor, com aumento de especificidade e diminuição de sensibilidade, pelo que devem ser utilizados para diagnóstico em combinação com outros antígenos (LUQUETTI & RASSI, 2000). A performance de alguns “kits” que utilizam diferentes combinações de proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos tem sido avaliada por vários grupos de pesquisa. Estes “kits” são baseados em ensaios imunoenzimáticos (“immunoblot” e ELISA) e testes imunocromatográficos (SILVEIRA et al., 2001).

2. Objetivos

2.1. Geral:

- Analisar o desempenho do “kit” EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e ao teste de Hemaglutinação visando estabelecer a combinação de dois testes que possam reduzir o número de reações inconclusivas ou indeterminadas.

2.2. Específico:

- Comparar as sensibilidade e especificidade do kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos, que utiliza o ELISA direto, com as técnicas de HAI e ELISA convencional.

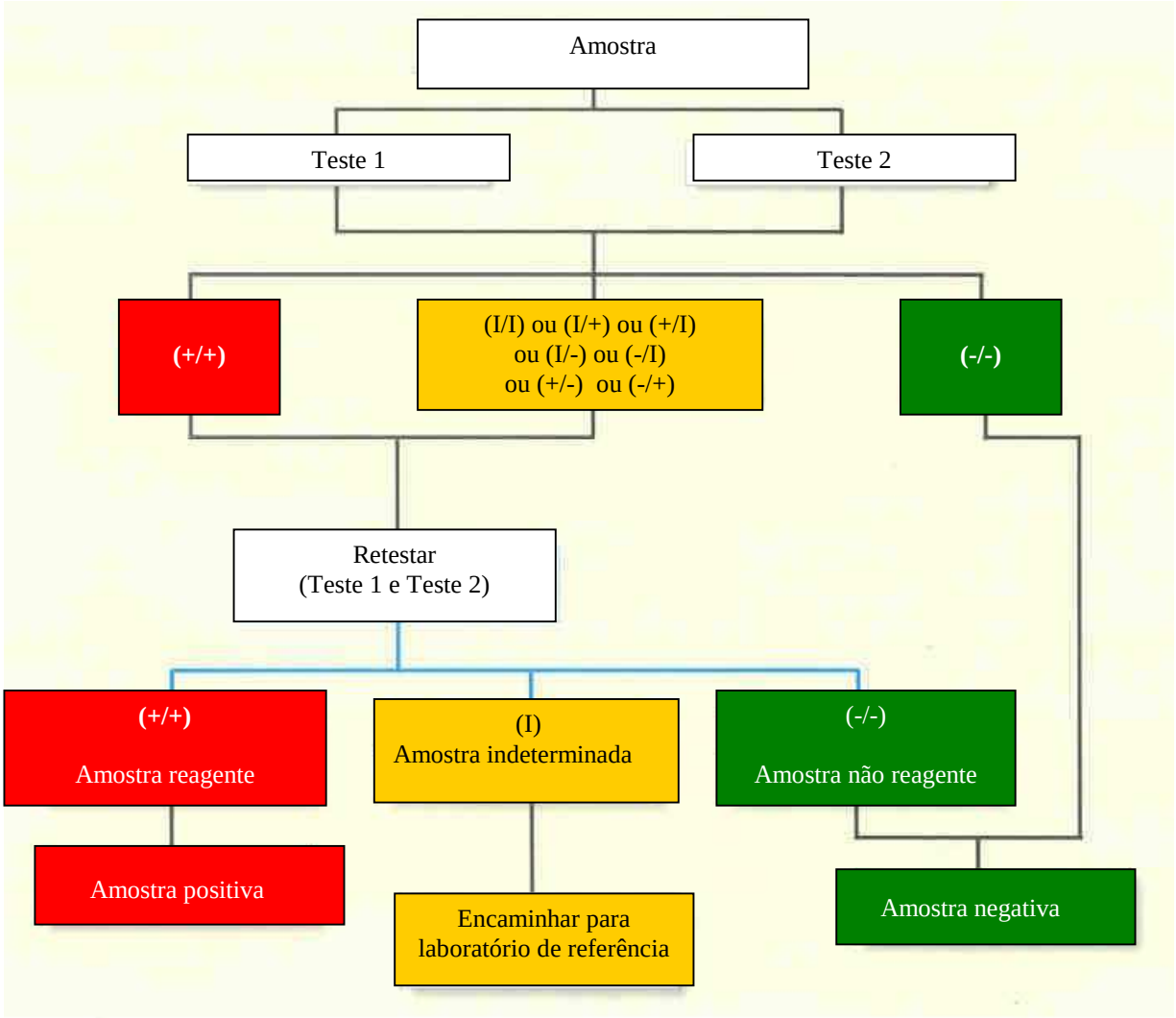


Fig. 1 - Diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em Laboratórios de Saúde Pública (Brasil, 1998).

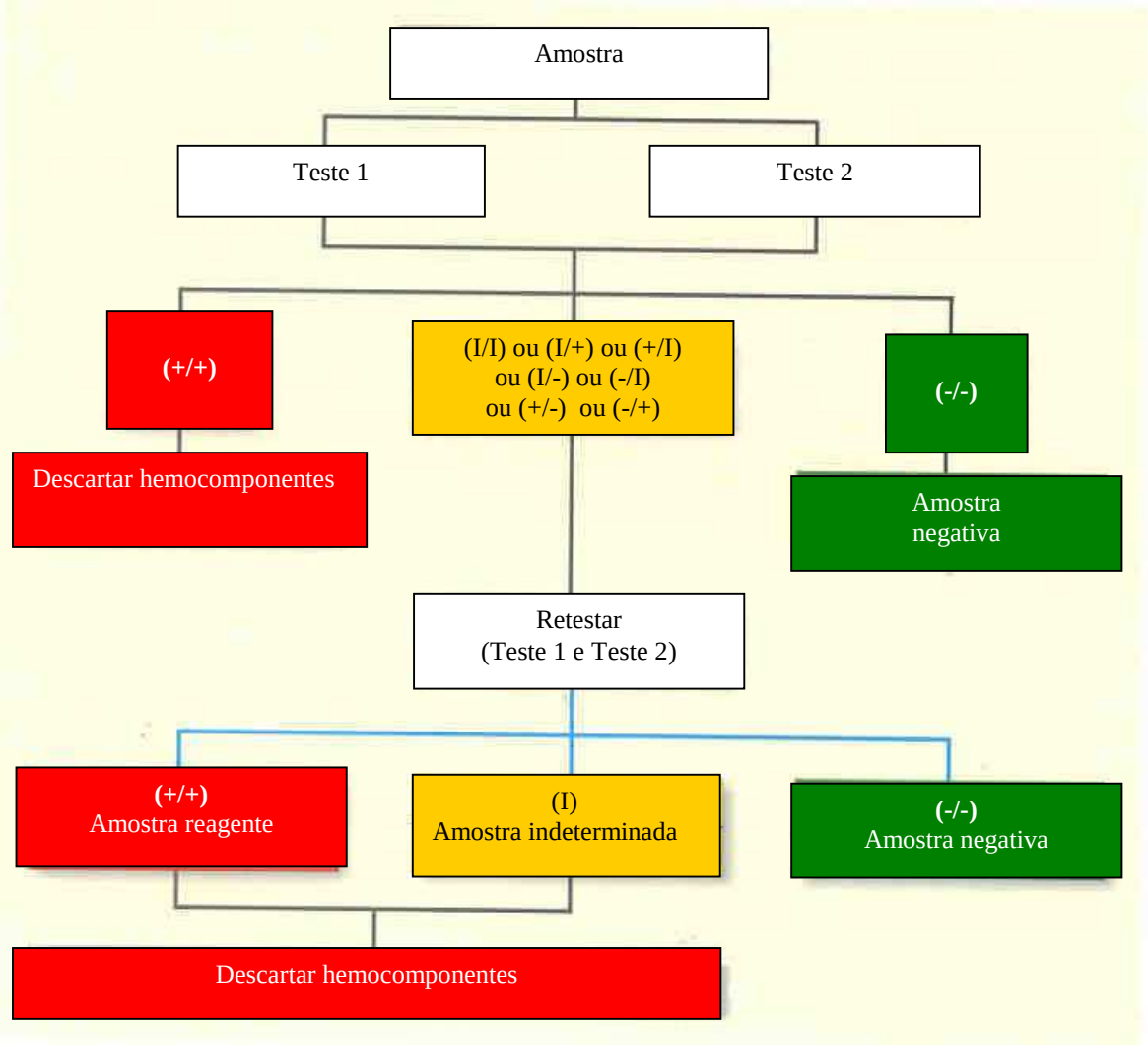
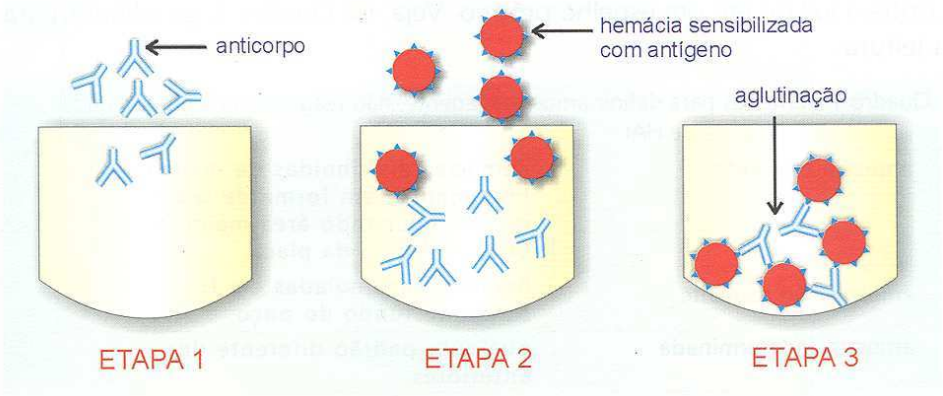
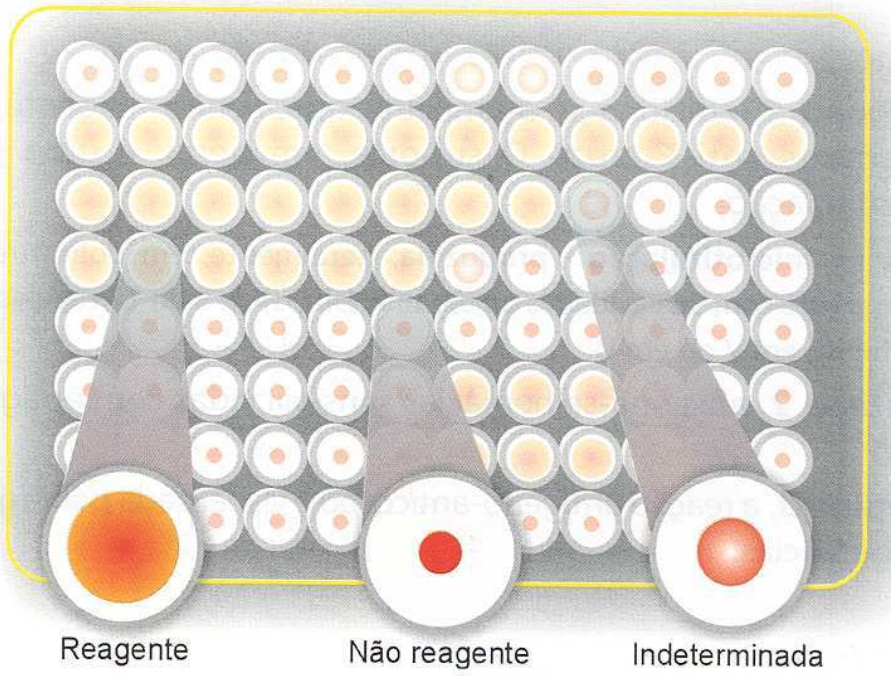


Fig. 2 - Triagem sorológica de doadores de sangue para a Infecção pelo *T. cruzi* (Brasil, 1998).

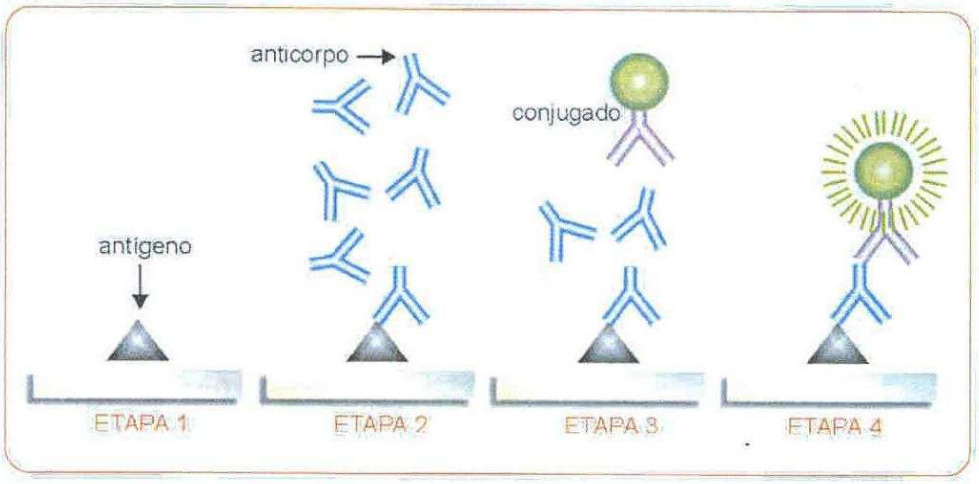


A

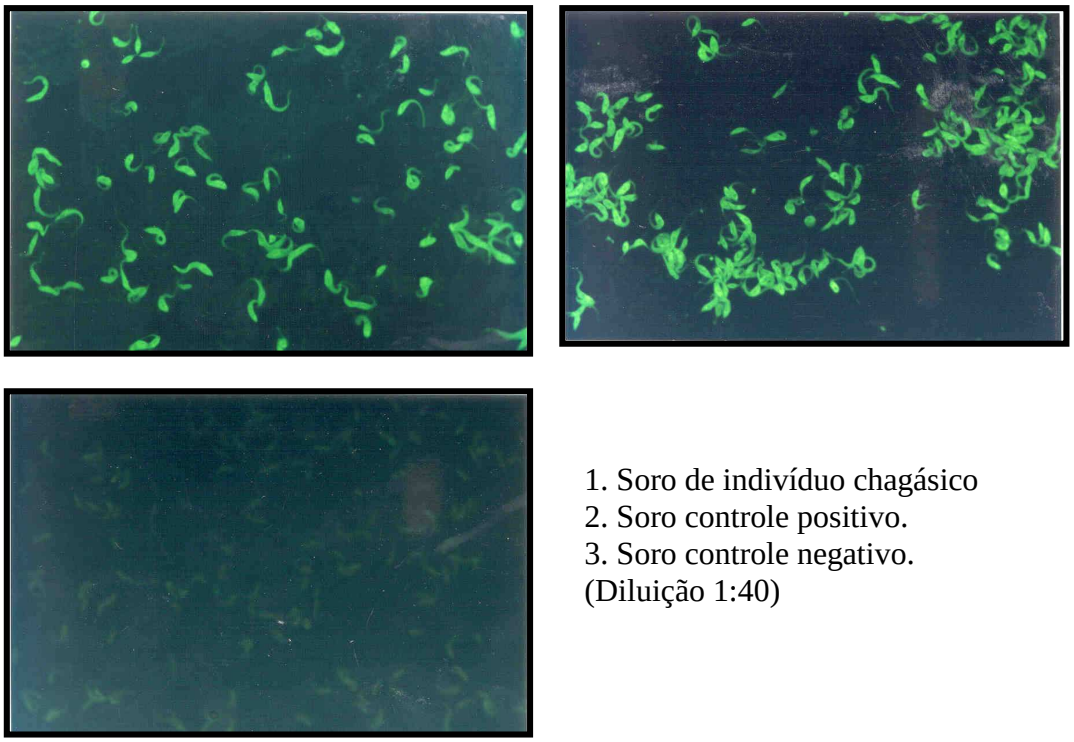


B

Fig. 3 - Testes de hemaglutinação indireta. A = Representação esquemática de uma reação de HAI. B = Visualização de amostra reagente, não reagente e indeterminada na reação de HAI. Segundo BRASIL, 1998.



A



B

1. Soro de indivíduo chagásico
2. Soro controle positivo.
3. Soro controle negativo.
(Diluição 1:40)

Fig. 4 – Reação de imunofluorescência indireta. A= representação esquemática da reação de IFI. B= visualisação da reação de IFI ao microscópio de fluorescência (material proveniente do Laboratório de Imunoparasitologia de Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ).

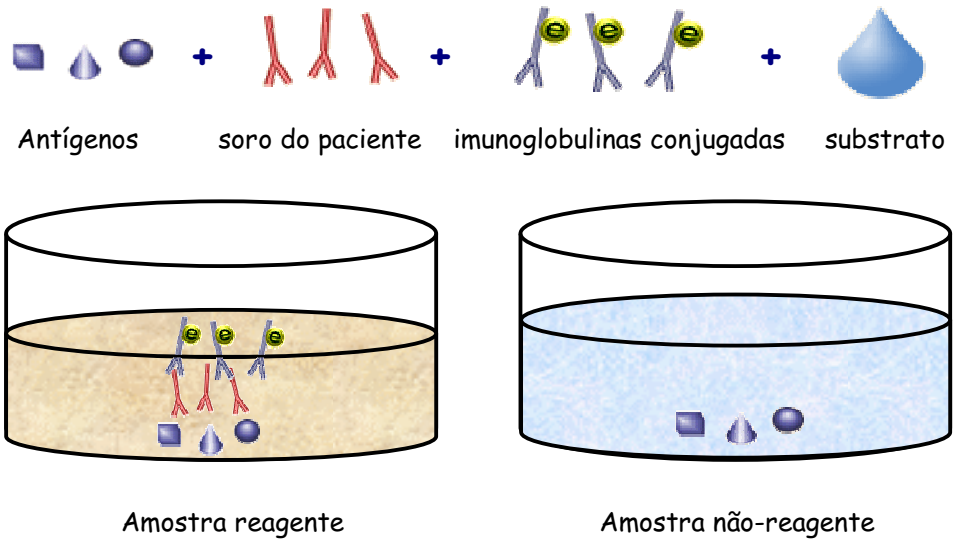


Fig. 5 – Representação esquemática da reação que ocorre no ELISA convencional.

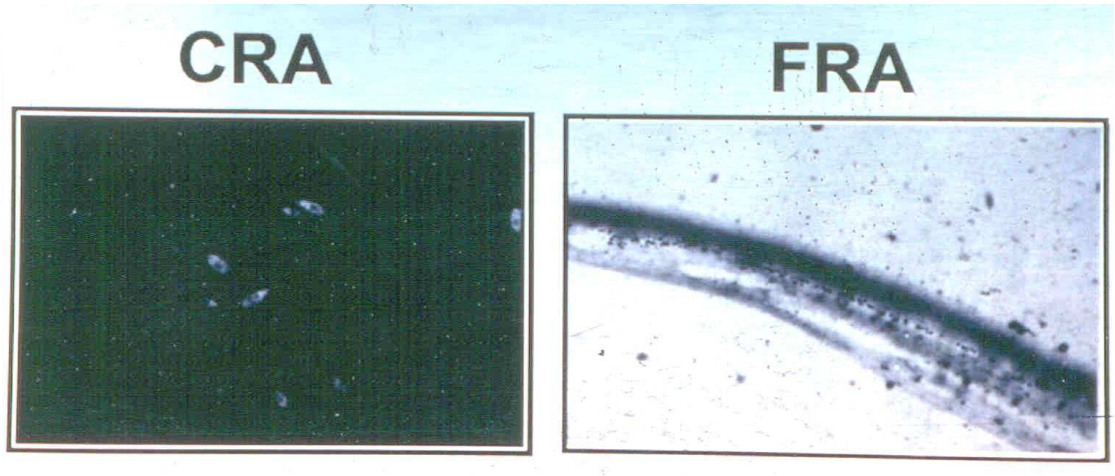


Fig. 6 - Localização celular dos antígenos CRA e FRA. CRA: reação de IFI sobre formas epimastigotas. FRA: reação de imunoperoxidase sobre formas tripomastigotas (flagelo). Segundo LAFAILLE *et al*. (1989).

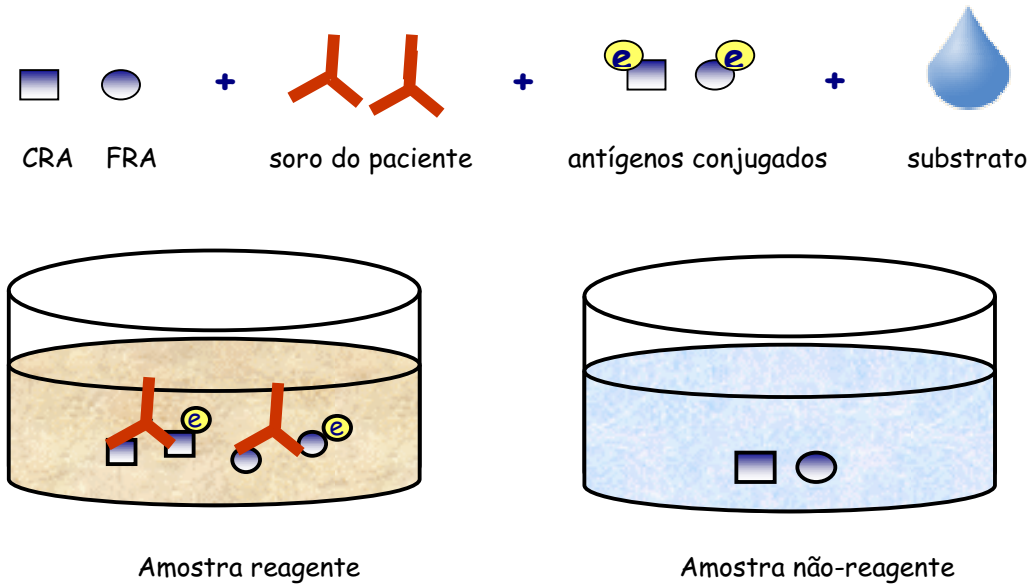


Figura 7 - Representação esquemática do ELISA direto utilizado no kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos.

3. Casuística e Métodos

3.1. Local de Coleta das Amostras

As amostras foram obtidas de pacientes atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Oswaldo Cruz (HUOC), de pacientes de demanda espontânea do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, de funcionários da Norclínicas, bem como soros que fazem parte da soroteca do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ e da rotina do Hemocentro de Pernambuco – Fundação Hemope.

O ambulatório de doença de Chagas, criado há 14 anos, é considerado um centro de referência no atendimento do paciente portador da doença de Chagas. Atualmente existem 1.300 pacientes cadastrados.

O CPqAM criado em 1950 e incorporado como Unidade Especial à Fundação Oswaldo Cruz desde 1970, realiza um trabalho sistemático de pesquisa e ensino no combate às grandes endemias. Esse órgão do Ministério da Saúde desenvolve importantes pesquisas sobre as endemias regionais sendo reconhecido internacionalmente pelo trabalho desenvolvido nas áreas de Esquistossomose, Filariose, Doença de Chagas, Peste e Malária.

O Hospital das Clínicas-HC da UFPE é uma Instituição vinculada ao Ministério da Educação, com função básica de apoiar o ensino de graduação e pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde-CCS, atuando como hospital-escola e centro de pesquisa científica em todas as áreas da medicina, orientando operacionalmente para quatro focos básicos a saber: ensino, pesquisa e extensão voltada a assistência à população; desempenhando importante papel como Hospital Referencial da Região.

A Norclínicas é uma empresa de prestação de serviços na área de saúde que atua no mercado do nordeste desde 1994. O principal foco de atividade médica da Norclínicas é a atuação no segmento de planos de saúde empresariais e está presente em todas as capitais do Nordeste, com uma ampla rede de atendimento. Além de consultas e atendimento nas especialidades básicas, a Norclínicas também oferece, em Centros Médicos próprios, o serviço de pronto atendimento, composto por uma equipe de médicos urgentistas em Clínica Médica, Cirurgia e Pediatria.

O Hemocentro de Pernambuco – Fundação HEMOPE, foi o primeiro hemocentro instalado no país. A Fundação HEMOPE está presente nas diversas regiões fisiográficas do estado, nas quais desenvolve, em parceria com 400 voluntários civis, amplo programa de captação de doadores voluntários de sangue, triagem clínica de doadores, coleta de sangue, fracionamento de componentes sanguíneos, testes laboratoriais de controle transfusional e dispensação de hemoterápicos aos hospitais públicos e privados do estado de Pernambuco.

3.2. Amostra do Estudo

3.2.1. Definição de Casos e Controles

Foram considerados controles indivíduos que nunca receberam transfusão sanguínea e nem habitaram em área endêmica para a doença (Tabela 3), que foram selecionados no CPqAM e na Norclínicas. Foram considerados casos, indivíduos com sinais e sorologia que caracterizaram a fase crônica da doença, apresentando ou não sintomas (Tabela 4). Estes, selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC e no HC da UFPE, são portadores das formas crônicas assintomática, digestiva,

cardíaca e mista apresentando as características descritas abaixo, conforme descrito por Barros (1999).

- Forma cardíaca assintomática (FCA): indivíduos abaixo de 50 anos, sem sintomas da doença, que apresentem bloqueio de ramo direito e/ou bloqueio ântero-divisional esquerdo.
- Forma cardíaca (FC): presença de sintomas de insuficiência cardíaca (dispnéia, edema de membros inferiores) ou síncope, portadores de marcapasso e/ou alteração eletrocardiográfica, tipo bloqueio de ramo direito, alterações da repolarização em parede anterior, bloqueio divisional ântero-superior esquerdo, bloqueios átrio-ventriculares e extra-sístoles ventriculares em pacientes sem outra patologia cardíaca. Diminuição da função ventricular (menor de 50%) ou aneurisma apical no ecocardiograma. Radiografia do tórax com aumento da área cardíaca definida com índice cárdio-torácico maior ou igual a 0,5 cm.
- Forma digestiva (FD): portadores de disfagia e ou constipação de mais de 1 semana e/ou passado de cirurgia para correção de “megas” ou, exame contrastado radiológico, evidenciando dilatação do esôfago ou cólon.
- Forma mista (FM): indivíduos com sintomatologia da FC e FD.

3.2.2 Dimensionamento da amostra

A amostra foi dimensionada para estimação de proporções, supondo-se sensibilidade e especificidade superiores a 90% e adotando-se um erro absoluto (semi amplitude do intervalo de confiança) entre 3% e 4%. Seriam então necessários 250 indivíduos em cada grupo (250 casos e 250 controles). No entanto, as características da

amostra planejada (forma crônica assintomática, cardíaca e digestiva) não permitiram que esse número fosse atingido (ver item 3.3).

Tabela 3 – Dados demográficos dos indivíduos não-chagásicos

Paciente No.	**Registro No.**	**Nome**	**Idade**	**Sexo**	**Naturalidade**	**Procedência**
1	2-001	FABS	32	M	Recife	Recife
2	2-002	LCA	35	M	Recife	Recife
3	2-003	JCM	39	F	Rio de Janeiro	Recife
4	2-004	JRMP	19	F	Recife	Recife
5	2-005	FLM	31	M	Recife	Olinda
6	2-006	DRDG	23	F	Recife	Recife
7	2-007	WAL	29	M	Recife	Recife
8	2-008	CFJA	27	F	Recife	Recife
9	2-009	OVS	28	M	Recife	Recife
10	2-010	MERES	59	F	Parnamirim	Recife
11	2-011	AAMG	28	F	Recife	Recife
12	2-012	VMBL	22	F	Recife	Recife
13	2-013	ESC	20	M	Recife	Recife
14	2-014	IM	34	M	Recife	Recife
15	2-015	EHGR	31	M	Recife	Recife
16	2-016	ADC	24	M	Recife	Recife
17	2-017	MBL	25	M	Recife	Recife
18	2-018	ELD	29	M	Recife	Recife
19	2-019	NAS	40	M	Rio de Janeiro	João Pessoa
20	2-020	FAMOC	19	M	Recife	Recife
21	2-021	YMMN	54	F	Recife	Recife
22	2-022	ELA	28	F	Recife	Recife
23	2-023	ELA	26	F	Recife	Recife

Tabela 3- Continuação

24	2-024	SS	37	F	Recife	Recife
25	2-025	TSF	22	M	Recife	Recife
26	2-026	REA	39	M	Recife	Olinda
27	2-027	PFCMDM	21	F	Recife	Recife
28	2-028	PSB	19	F	Recife	Recife
29	2-029	HBL	29	M	Recife	Recife
30	2-030	PAPS	25	M	Recife	Jaboatão
31	2-031	CLM	24	F	Recife	Recife
32	2-032	EJMN	25	M	Recife	Recife
33	2-033	AETMS	22	F	Recife	Recife
34	2-034	JFMS	25	F	Recife	Recife
35	2-035	BBPB	21	M	Recife	Recife
36	2-036	RMC	21	M	Recife	Recife
37	2-037	JFR	23	F	Recife	Recife
38	2-038	WFS	31	F	Jaboatão	Jaboatão
39	2-039	FND	22	M	Recife	Recife
40	2-040	BCM	21	F	Recife	Recife
41	2-041	RK	21	M	Recife	Recife
42	2-042	JEXSB	20	F	Recife	Recife
43	2-043	GTS	24	F	Recife	Recife
44	2-044	JMA	21	M	Recife	Recife
45	2-045	AALF	21	M	Recife	Recife
46	2-046	APSM	23	F	Recife	Recife
47	2-047	CFAL	19	F	Recife	Recife
48	2-048	RAQ	22	M	Recife	Jaboatão
49	2-049	LFWV	32	M	Recife	Recife
50	2-050	JLBLJ	20	M	Recife	Recife
51	2-051	RAL	23	M	Recife	Jaboatão
52	2-052	KSA	21	F	Olinda	Olinda
53	2-053	CAL	20	F	Recife	Recife

Tabela 3- Continuação

54	2-054	EBVA	19	M	Recife	Paulista
55	2-055	NBB	18	F	Recife	Recife
56	2-056	BSL	24	F	Recife	Olinda
57	2-057	RALSM	21	M	Recife	Recife
58	2-058	RAM	32	F	Recife	Recife
59	2-060	LCNHB	37	F	Rio de Janeiro	Recife
60	2-061	LMLM	27	F	Recife	Recife
61	2-062	DSMVL	19	F	Cabo	Recife
62	2-063	ASS	28	F	Recife	Recife
63	2-064	LGL	24	F	Recife	Recife
64	2-065	AHAS	18	F	Recife	Recife
65	2-066	PFS	19	F	Recife	Recife
66	2-067	WSS	32	M	Recife	Recife
67	2-068	RJM	25	M	Recife	Recife
68	2-069	JCM	32	F	Recife	Recife
69	2-070	SCBT	28	F	Recife	Recife
70	2-071	SAS	30	M	Recife	Recife
71	2-072	MARLS	36	M	Recife	Recife
72	2-074	AKSM	25	F	Recife	Recife
73	2-075	CALM	54	M	Recife	Recife
74	2-076	EPM	25	F	Recife	Recife
75	2-077	RMPS	48	F	Recife	Recife
76	2-078	GGS	38	M	Recife	Recife
77	2-079	MASM	52	F	Recife	Recife
78	2-080	OAS	58	F	São Paulo	Recife
79	2-081	KPS	28	M	Recife	Recife
80	2-082	DMSM	24	F	Recife	Recife
81	2-083	SLAG	36	F	Olinda	Recife
82	2-084	ARCB	24	F	Recife	Recife
83	2-085	APC	48	F	Olinda	Camaragibe

Tabela 3- Continuação

84	2-086	RACL	31	F	Recife	Recife
85	2-087	RFV	30	F	Belém	Recife
86	2-088	CSMAB	24	F	Recife	Recife
87	2-089	ARS	33	F	Recife	Recife
88	2-090	STL	34	F	Recife	Olinda
89	2-091	SRP	25	F	Recife	Olinda
90	2-092	ACL	33	F	Recife	Olinda
91	2-093	COM	33	F	Olinda	Olinda
92	2-094	CLV	24	F	Recife	Recife
93	2-096	EJS	22	F	Recife	Recife
94	2-097	ASS	40	F	Recife	Recife
95	2-098	ASGS	30	F	Recife	Olinda
96	2-099	SMSFT	40	F	Recife	Recife
97	2-100	MMAM	42	F	Recife	Recife
98	2-101	JLS	42	F	Recife	Recife
99	2-102	TAM	21	F	Recife	Jaboatão
100	2-103	CW	37	M	Porto Alegre	Recife
101	2-104	ACS	20	F	Recife	Paulista
102	2-105	NM	34	F	Recife	Recife
103	2-106	MAS	25	F	Recife	Paulista
104	2-107	APN	22	F	Rio de Janeiro	Recife
105	2-108	LSPD	21	F	Recife	Recife
106	2-109	RMLA	27	F	S. Lourenço da Mata	Camaragibe
107	2-110	EJS	22	F	Recife	Paulista
108	2-111	AMC	23	F	Recife	Recife
109	2-112	SAS	32	F	Recife	Recife
110	2-113	SCL	32	F	Rio de Janeiro	Paulista
111	2-114	GFA	33	M	Campina Grande	Paulista
112	2-115	CVS	33	F	Recife	Recife
113	2-116	NPJ	21	M	Recife	Recife

Tabela 3- Continuação

114	2-117	AAC	43	M	Recife	Olinda
115	2-118	MFAM	42	M	Recife	Recife
116	2-119	MMS	32	F	Recife	Recife
117	2-120	GORF	35	M	Recife	Recife
118	2-121	ACS	31	F	Recife	Recife
119	2-122	IMH	30	F	Recife	Recife
120	2-123	MCL	22	F	Recife	Recife
121	2-124	GDS	27	F	Recife	Recife
122	2-125	KRS	28	F	Recife	Recife
123	2-126	GJS	27	M	Recife	Jaboatão
124	2-127	MRS	27	F	Recife	Camaragibe
125	2-128	LHRF	22	F	Recife	Recife
126	2-129	SCBS	32	M	Recife	Recife
127	2-130	VCS	39	F	Recife	Recife
128	2-131	GKPM	19	F	Recife	Olinda
129	2-132	SAS	27	F	Recife	Paulista
130	2-133	DRS	28	F	Recife	Recife
131	2-134	IMFM	39	F	Recife	Recife
132	2-135	HMA	30	F	Jaboatão	Recife
133	2-136	RLS	19	F	João Pessoa	Olinda
134	2-137	CFC	23	F	Paulista	Paulista
135	2-138	LMB	31	F	Recife	Olinda
136	2-139	MSM	36	F	Recife	Recife
137	2-140	MPF	41	F	Recife	Recife
138	2-141	MGMS	25	F	Paulista	Paulista
139	2-143	MBG	21	F	Camaragibe	Camaragibe
140	2-144	HRC	38	F	Recife	Recife
141	2-145	WHSS	22	M	Recife	Paulista
142	2-146	LGM	28	F	Recife	Recife
143	2-147	CLNF	18	M	Recife	Recife

M- Masculino, F- Feminino

Tabela 4 – Dados demográficos e forma clínica dos indivíduos chagásicos

Paciente No.	Registro No.	Nome	Forma clínica	Idade	Sexo	Naturalidade	Procedência
1	133995	SFS	FC	64	F	Nazaré da Mata	Recife
2	106422	SFS	FC	61	M	Cruz do Espírito Sto. (PB)	Machado
3	106673	ITL	FC	55	F	Vicência	Camaragibe
4	71321	JVC	FC	61	M	Limoeiro (CE)	Recife
5	51624	PLF	FC	45	M	Vicência	Camaragibe
6	103255	MC	FC	69	F	Limoeiro	Recife
7	573320	SLS	FC	NR	M	Paudalho	Paulista
8	127612	JBF	FC	46	M	Vicência	Vicência
9	122138	EMS	FCA	47	F	São Vicente Férrer	Olinda
10	85558	AJR	FC	57	F	Limoeiro	Recife
11	110793		FC	50	F	NR	NR
12	74651	JSA	FCA	62	F	Vicência	Recife
13	96361	MMS	FM	57	M	Limoeiro	Recife
14	118317	RMS	FM	64	F	Limoeiro	Araçaúba
15	57628	GAN	FCA	65	F	Nazaré da Mata	Carpina
16	50718	MB	FC	37	F	Vicência	Recife
17	28341	RJL	FC	54	F	Tuparetama	Camaragibe
18	123923	JLM	FC	46	F	Bom Jardim	Bom Jardim
19	124543	RSS	FC	56	F	Santana do Mundaú (AL)	Santana do Mundaú (AL)
20	51809	MJF	FC	72	F	Carpina	Santana do Mundaú (AL)
21	125935	JPSF	FC	60	M	Aliança	Camaragibe
22	26389	JS	FM	66	F	Vicência	Recife

Tabela 4 - Continuação

23	35085	TJS	FC	61	F	NR	NR
24	104348	MJF	FC	69	F	Carpina	Santana do Mundaú (AL)
25	123478	JRS	FC	71	F	Carpina	
26	117047	HES	FC	70	M	Nazaré da Mata	Nazaré da Mata
27	72379	STS	FC	64	F	Goiana	Recife
28	MRS	MRS	FD	60	F	Nazaré da Mata	Recife
29	121776	MLS	FCA	48	F	Timbaúba	Recife
30	125291	PS	FC	NR	F	NR	NR
31	79937	RMN	FM	57	F	Vicência	Recife
32	83028	LES	FC	65	M	Vicência	Recife
33	134893	ON	FC	50	F	Catenda	Jaboatão
34	42701	GAP	FC	66	F	Vicência	Recife
35	153625	ACS	FC	41	M	Rio de Janeiro	Recife
36	120099	TMN	FC	61	F	Vicência	Recife
37	118113	BMC	FC	64	F	Vicência	Olinda
38	77188	JM	FC	59	M	Pionéo (PB)	Recife
39	70371	MJS	FC	54	F	Timbaúba	Recife
40	100481	MVJ	FC	63	M	Bom Jardim	Recife
41	55657	BAS	FC	51	F	Bom Jardim	São Lourenço da Mata
42	22702	MGS	FCA	56	F	Itambé	Recife
43	149447	SBN	FC	53	M	Itambé	Olinda
44	54709	JPJ	FC	54	M	Limoeiro	Recife
45	106560	SAB	FC	51	F	São Vicente Férrer	Recife
46	87214	MSPA	FC	65	F	Vicência	Recife
47	106448	MES	FCA	35	F	Recife	Recife
48	102169	EES	FC	63	F	Aliança	Recife
49	128873	JMP	FC	70	M	Recife	Recife

Tabela 4 - Continuação

50	70139	MJSB	FC	56	M	Lajedo	Recife
51	124748	EFP	FC	61	F	Nazaré da Mata	Recife
52	66872	RMS	FC	61	F	Buenos Aires	Recife
53	38837	ML	FC	44	M	Igarapeba	Recife
54	114961	JSS	FC	61	M	João Alfredo	Recife
55	75822		FC	65	M	NR	NR
56	125118	JJC	FC	46	F	Simões (PI)	Araripina
57	128876	JAS	FD	82	M	Vicência	Camaragibe
58	54437	MMS	FC	NR	F	Nazaré da Mata	Recife
59	132550	SMS	FCA	50	F	Maceió (AL)	Água Preta
60	104209	AVC	FC	72	F	Triunfo	Triunfo
61	135959	MCS	FC	47	F	Surubim	Recife
62	99228	FGS	FC	70	F	Nazaré da Mata	Jaboatão
63	6577	MGV	FC	68	M	Triunfo	Recife
64	128874	MMC	FC	45	F	Maraial	Recife
65	67293	FAF	FC	50	F	Triunfo	Jaboatão
66	67737	IDS	FD	61	M	Nazaré da Mata	Recife
67	31981	AGF	FC	59	M	Limoeiro	Jaboatão
68	54615	RNA	FC	55	F	Triunfo	Recife
69	106407	JRS	FC	63	M	Carpina	Recife
70	0101	MBS	FC	50	M	São Benedito do Sul	São Benedito do Sul
71	0501	JSS	FCA	34	M	São Benedito do Sul	São Benedito do Sul
72	2701	HBS	FD	59	M	NR	NR
73	5101	JLAS	FC	28	F	NR	NR
74	5106	SBS	FC	37	M	NR	São Benedito do Sul
75	5602		FC	38	M	NR	São Benedito do Sul

Tabela 4 - Continuação

76	6001	LMS	FC	48	F	NR	São Benedito do Sul
77	6302	JAS	FC	NR	M	NR	NR
78	6304	BMS	FC	21	F	São Benedito do Sul	São Benedito do Sul
79	6401	LMS	FC	55	F	NR	São Benedito do Sul
80	6702	CJS	FCA	42	M	NR	NR
81	7202	FSA	FC	36	M	NR	São Benedito do Sul
82	100-01	PMAS	FC	38	F	NR	NR
83	109-01	MCS	FCA	61	F	São José da Lage	São Benedito do Sul
84	55387	FJS	FM	62	M	Buenos Aires	Carpina
85	46911	EGA	FCA	71	F	Pesqueira	Recife
86	106455	DDC	FC	53	M	Itambé	Caaporã (PB)
87	128582		FD	48	F	NR	NR
88	106520		FC	66	F	NR	NR
89	1001		FD	48	F	São Benedito do Sul	São Benedito do Sul
90	Chc 002	BES	FC	49	M	União dos Palmares (AL)	Vitória de Santo Antão
91	Chc 003	SMMA	FC	58	F	Glória do Goitá	Recife
92	Chc 004	JAL	FC	55	M	Alagoinha	Alagoinha
93	Chc 005	RQN	FC	52	F	Catende	Jaboatão
94	Chc 006	LMS	FC	50	F	São Benedito do Sul	Recife
95	Chc 007	MJBL	FC	53	F	Cupira	Recife
96	Chc 008	JTS	FC	52	M	São José da Lage	Recife

Tabela 4 - Continuação

97	Chc 009	SLL	FC	48	F	Goiana.	Cidade Nova
98	Chc 010	MJFS	FC	46	F	Carpina	Recife
99	Chc 011	MJTS	FC	61	F	Timbaúba	Recife
100	Chc 012	JMG	FC	57	M	Carpina	Carpina
101	Chc 013	MLML	FC	60	F	Triunfo	Triunfo
102	Chc 015	MJFL	FC	48	F	Ouro Velho (PB)	Arcoverde
103	Chc 016	JMA	FCA	59	F	São João do Tigre (Cariri) (PB)	Sanharó
104	Chd 001	MLD	FD	52	M	Bezerros	Recife
105	133284	LMC	FCA	40	F	Camucin de São Félix	Bonito
106	127617	SMS	FC	53	F	Itambé	Goiana
107	1116239	MNS	FD	55	F	Interior do Amazonas	Princesa Isabel (PB)
108	61199	SAX	FD	66	M		Recife
109	48874	MJS	FC	67	F	Nazaré da Mata	Recife
110	28334	RSS	FCA	66	F	Lagoa do Carmo	Carpina
111	108558	DLR	FCA	48	M	Vitória de Santo Antão	Vitória de Santo Antão
112	75708	MLA	FC	59	M	São José da Lage (AL)	Recife

M- Masculino, F- Feminino, FC- Forma Cardíaca, FD- Forma Digestiva, FM- Forma Mista, FCA- Forma Cardíaca Assintomática

3.3. Amostras coletadas

Foram utilizados duzentos e oitenta e sete soros – 112 obtidos de indivíduos chagásicos na forma crônica distribuídos da seguinte maneira: forma cardíaca assintomática (n=15), forma cardíaca (n=82), forma digestiva (n=9) e forma mista (n=6); 143 de indivíduos não-chagásicos e 32 de indivíduos com outras doenças infecto-parasitárias: sífilis (n=11), hepatite C (n=7), HIV (n=9) que foram obtidos na rotina da Fundação Hemope e, leishmaniose cutânea (n=5) obtidos da soroteca do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM. Os indivíduos que participaram da pesquisa foram avaliados pelo médico responsável quando deram um consentimento por escrito (Anexo 1) e foram submetidos a um questionário (Anexo 2) para obtenção de dados pessoais, epidemiológicos e exame clínico. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (Anexo 3).

O sangue foi coletado pelo sistema a vácuo, Vacutainer®, pela mestranda e por uma estudante de Biomedicina, bolsista do Programa Integrado de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do CPqAM, também inserida no presente projeto. O sangue foi centrifugado e o soro armazenado a –20°C. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM.

3.4. Processamento das amostras

Anticorpos anti-*T. cruzi* foram detectados através dos testes de HAI, ELISA-Con e ELISA-Rec seguindo recomendações do fabricante.

Teste de HAI – Foi utilizado o kit comercial HEMACRUZI (Cod. 029.015, lotes H10451H e H20158JB), da empresa Biolab-Mérieux S.A. Em cada poço de uma placa de microtitulação foram depositados 50 µl dos soros a testar diluídos (1/40) em uma solução de 2-mercaptoetanol (2-ME) a 0,1 M seguindo a adição de 25 µl da suspensão de hemácias de aves sensibilizadas com antígenos solúveis de *T. cruzi*. Após leve agitação a placa foi deixada em repouso por 1 h, à temperatura ambiente, quando a leitura foi realizada a olho nu. A reação foi considerada positiva quando um véu uniforme de hemácias recobriu toda a cavidade do poço, podendo estar às vezes parcialmente retraído nas bordas. A reação foi considerada fracamente positiva quando um véu pouco nítido, apresentando pequeno depósito de hemácias no fundo da cavidade foi visualizado. A reação foi considerada negativa quando um botão compacto de hemácias depositou-se no fundo do poço. Parte dos kits HEMACRUZI foram doados pela empresa Biolab-Merieux.

ELISA Con - Foi utilizado o kit comercial "Premier™ Chagas' IgG ELISA (Lotes TCE100.011, TCE 100.014) da empresa Meridian Diagnostics, Inc. Em cada poço de uma placa de microtitulação sensibilizada com antígeno purificado de *T. cruzi* foram depositados 100 µl dos soros a testar diluídos a 1/21 seguindo incubação por 30 min a 37°C. Após lavagens, foram adicionados 100 µl do conjugado (anti-IgG humana produzida em cabra, conjugada à fosfatase alcalina) e a placa incubada por 30 min a 37°C. Seguindo novas lavagens, 100 µl da solução substrato (p-NPP – p-nitrofenil fosfato) foram adicionados e a placa incubada por 30 min a 37°C. A reação foi bloqueada por depositar em cada poço 100 µl da solução de bloqueio (NaOH, 1,5 N). A leitura da reação foi efetuada em um leitor de ELISA a 405 nm. O CO e a zona cinza

foram calculados para cada placa conforme o fabricante. Soro com DO igual ou acima do CO foram considerados reativos, e conseqüentemente positivos para anticorpos anti-*T. cruzi*. Soros com DO abaixo do CO foram considerados não reagentes e negativos para anticorpos anti-*T. cruzi*.

ELISA-Rec - Microplacas sensibilizadas com os Ag-Recs foram incubadas a 37^{o}C por 30 min com o soro não diluído do paciente (50µl). Após lavagens para remover os anticorpos não ligados, as placas foram incubadas por 30 min a 37^{o}C com 50 µl de antígenos conjugados à peroxidase. Após lavagens os imunocomplexos foram revelados pela adição de peróxido de hidrogênio e 3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina. A reação foi bloqueada com H_2SO_4 2M, e a DO foi determinada a 450 nm. O CO e a zona cinza foram calculados para cada placa conforme o fabricante. Soro com DO igual ou acima do CO foram considerados reativos, e conseqüentemente positivos para anticorpos anti-*T. cruzi*. Soros com DO abaixo do CO foram considerados não reagentes e negativos para anticorpos anti-*T. cruzi*. Os kits EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos foram doados por Biomanguinhos/Fiocruz (Lotes 014CR001Z e 023CR001Z).

3.5. Análise Estatística

A sensibilidade e especificidade foram estimadas de acordo com Ferreira & Ávila (2001), utilizando uma tabela de dupla entrada relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste (Tabela 5).

Tabela 5 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença

TESTES	**DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro**	
	Presente	**Ausente**
Positivo	Positivos verdadeiros **A**	Positivos falsos **B**
Negativo	Negativos falsos **C**	Negativos verdadeiros **D**

Segundo Ferreira & Ávila (2001)

A sensibilidade (S) do teste foi dada pela percentagem de positivos entre os indivíduos sabidamente chagásicos. A especificidade (E), pela percentagem de negativos, entre indivíduos não chagásicos, conforme as fórmulas a seguir:

$$S = \frac{A}{A + C} \qquad E = \frac{D}{B + D}$$

Foi utilizado o pacote EPI-INFO 6.04 para a administração, análise dos dados, dimensionamento da amostra e cálculo de intervalos de confiança, com grau de confiança de 95%.

4. Resultados

Os resultados obtidos com os diferentes testes utilizados, HAI, ELISA-Con e ELISA-Rec, são mostrados nos Anexos 4 e 5.

Na análise sorológica dos 112 pacientes chagásicos através do teste de HAI, os seguintes resultados foram obtidos: 59 reagentes, 13 não-reagentes (falso-negativos) e 40 inconclusivos. Ambos ELISAs identificaram 110 dos 112 pacientes chagásicos e nenhum resultado inconclusivo foi observado. Entretanto, 2 resultados não-reagentes (falso-negativos) foram detectados nos ELISAs (Figs. 8 e 9 e Tabela 6). Estes dois resultados falso-negativos foram obtidos de diferentes pacientes chagásicos (Tabela 8).

Os pacientes chagásicos (número de registro – NR = 28334 e 108558), ambos portando a FCA, não foram identificados pelo ELISA-Rec. Entretanto, ambos foram identificados pelo ELISA-Con. Os pacientes com NR 133284 e Ch 015, com FCA e FC, respectivamente, não foram identificados pelo ELISA-Con, mas foram reconhecidos pelo ELISA-Rec (Tabela 8). O teste de HAI não identificou 13 pacientes chagásicos, incluindo NR 133284 e Ch 015 (Tabela 8).

A sensibilidade e especificidade dos testes analisados estão apresentados na Tabela 6. Todos os testes apresentaram 100% de especificidade (IC 95%: 96,7-100%), as amostras de todos os indivíduos não-chagásicos (143) foram não-reagentes em todos os testes avaliados.

A sensibilidade do ELISA-Rec e ELISA-Con foi 98,2% (IC 95%: 93,1-99,7%), enquanto a sensibilidade do teste de HAI foi 52,7% (IC 95%: 43,1-62,1%).

Quando o ELISA-Rec e o teste de HAI foram analisados em combinação, 52 resultados inconclusivos e 1 falso-negativo foram observados (Tabela 7). Resultados similares foram obtidos quando o ELISA-Con e o teste de HAI foram combinados, 51

resultados inconclusivos, além de 2 resultados falso-negativos foram obtidos (Tabela 7). Quando a combinação foi realizada com o ELISA-Rec e o ELISA-Con, o número de resultados inconclusivos foi reduzido para 4 (Tabela 7). Dentre estes estavam presentes os 2 casos falso-negativos obtidos pela combinação do ELISA-Con e do teste de HAI, os quais foram reagentes quando testados pelo ELISA-Rec (Tabela 8). Quanto aos outros dois casos, foram reagentes no ELISA-Con e não reagentes no ELISA-Rec (Tabela 8).

Quando testamos os soros de indivíduos com outras doenças infecciosaase parasitárias através do ELISA-Rec e do ELISA-Con, todos os resultados foram não-reagentes. Porém, quando testamos com o teste de HAI, obtivemos 4 resultados reagentes. O teste de HAI apresentou reação cruzada com 1 paciente portador de sífilis (n=11), 1 de hepatite C (n=7) e com 2 de leishmaniose cutânea (LC) (n=5) (Tabela 9). As DO das amostras analisadas através do ELISA-Rec e ELISA-Con são mostradas nas Figs. 8 e 9.

Tabela 6 - Performance do diagnóstico da doença de Chagas através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste HAI

	ELISA-Rec		ELISA-Con		HAI	
Resultados	Casos[a]	Controles[b]	Casos[a]	Controles[b]	Casos[a]	Controles[b]
Positivos	110	0	110	0	59	0
Negativos	2	143	2	143	13	143
Inconclusivos	0	0	0	0	40	0
Sensibilidade (%)	98,2	-	98,2	-	52,7	-
Especificidade (%)	-	100	-	100	-	100

a:n=112

b:n=143

Tabela 7 - Comparação da reatividade do ELISA-Rec, do ELISA-Con e do teste de HAI

Resultados	ELISA-Rec + HAI	ELISA-Con + HAI	ELISA-Rec + ELISA-Con
Positivo	59	59	108
Inconclusivo	52	51	4
Negativo	1	2	0

Tabela 8 - Amostras representativas dos resultados falso-negativos obtidos através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de HAI

Pacientes Nº *	Registro Nº	FC	HAI	ELISA-Rec	ELISA-Con
110	28334	CA	-	-	+
109	48874	C	-	+	+
111	108558	CA	+	-	+
11	110793	C	-	+	+
9	122138	CA	-	+	+
105	133284	CA	-	+	-
95	Ch 007	C	-	+	+
96	Ch 008	C	-	+	+
102	Ch 015	C	-	+	-
50	70139	C	-	+	+
64	128874	C	-	+	+
81	7202	C	-	+	+
82	100-01	C	-	+	+
94	Ch 006	C	-	+	+

FC = Forma clínica; CA = forma cadíaca assintomática, C = forma cardíaca; HAI = hemaglutinação indireta, ELISA-Rec = ELISA recombinante, ELISA-Con = ELISA convencional

* Número de paciente equivalente ao contido no anexo 4.

Tabela 9 - Comparação da reatividade dos soros de indivíduos portadores de outras doenças infecciosas e parasitárias através do ELISA-Rec e dos métodos sorológicos convencionais

Soro	HAI	ELISA-Con	ELISA-Rec
Sífilis (n= 11)	1	0	0
HCV (n= 7)	1	0	0
HIV (n= 9)	0	0	0
LC (n= 5)	2	0	0

HAI – hemaglutinação indireta; ELISA-Con – ELISA convencional; ELISA-Rec – ELISA recombinante; HCV – Vírus da hepatite C; HIV – Vírus da imunodeficiência humana; LC – Leishmaniose cutânea.

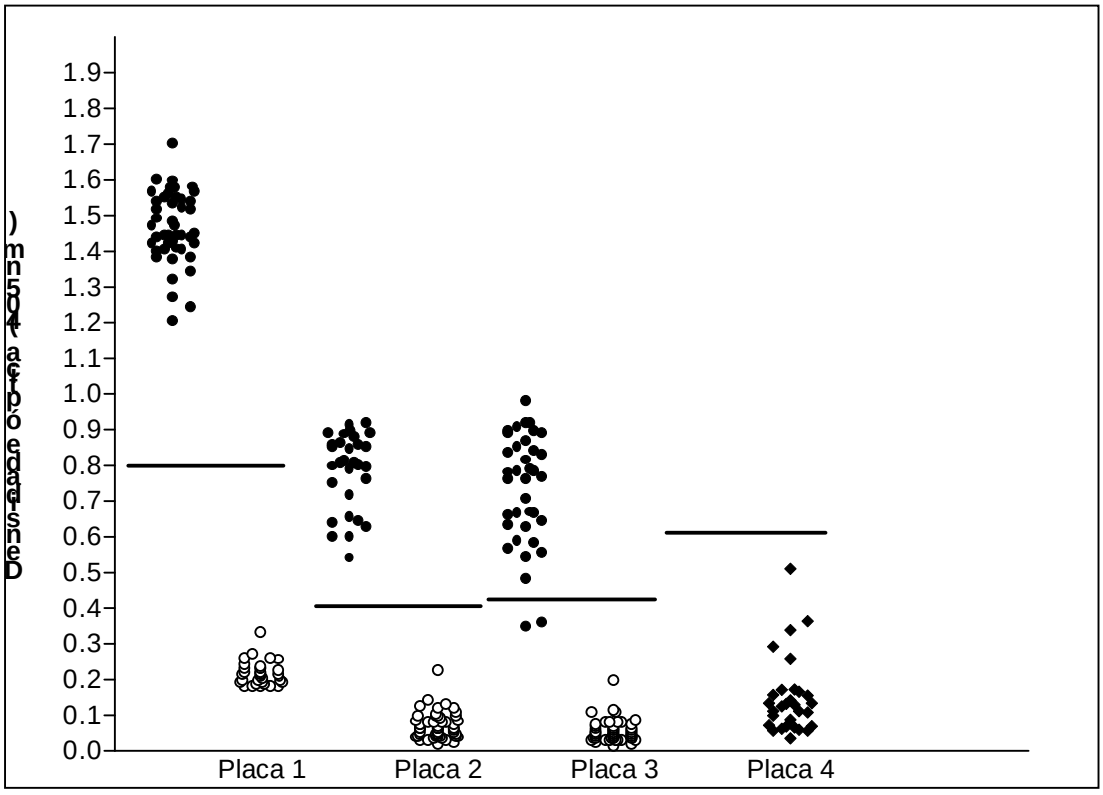


Fig. 8 - Densidade óptica das amostras analisadas através do ELISA-Con. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. (●) paciente chagásico; (○) paciente não-chagásico; (◆) indivíduo portador de outra doença infecciosa e parasitária (sífilis, HCV, HIV e LC).

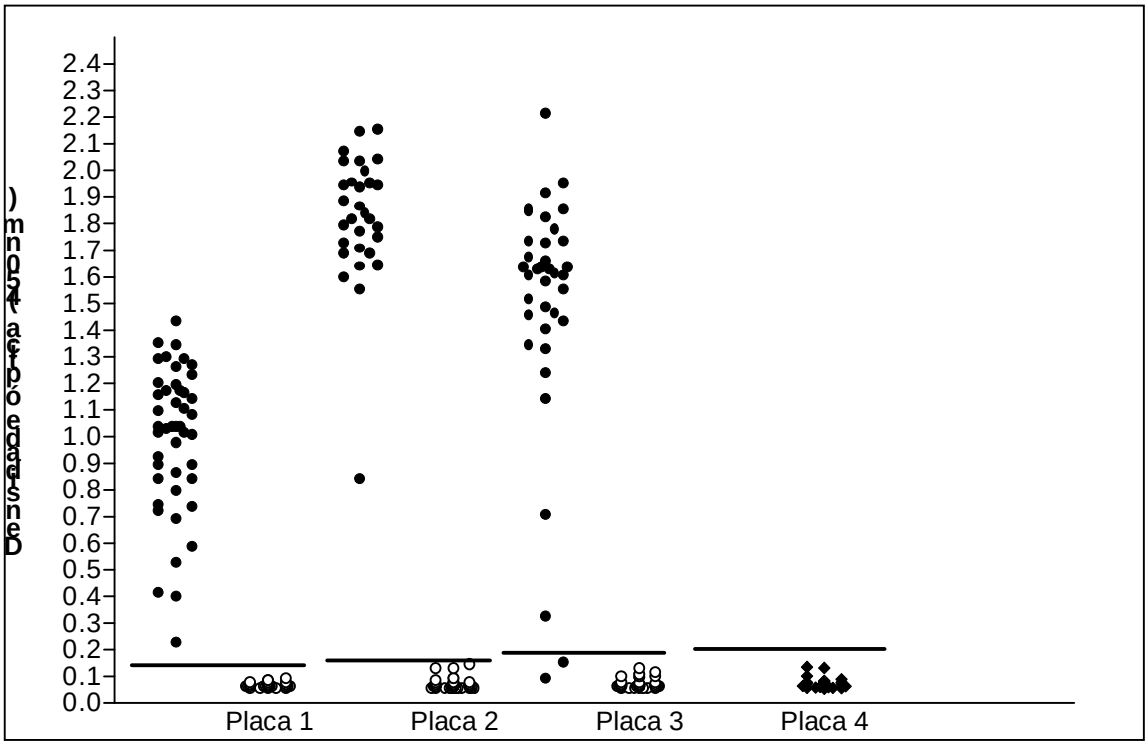


Fig. 9 - Densidade óptica das amostras analisadas através do ELISA-Rec. A linha no interior da distribuição dos pontos representa o limiar de reatividade. (●) paciente chagásico; (○) paciente não-chagásico; (◆) indivíduo portadore de outra doença infecciosa e parasitária (sífilis, HCV, HIV e LC).

5. Discussão

Apesar dos avanços alcançados no controle da transmissão natural da doença de Chagas, especialmente na sub-região do Cone Sul, a infecção chagásica continua sendo um importante problema de saúde pública. Ações permanentes de vigilância são necessárias para que os níveis de controle sejam mantidos (ANDRADE, 2000).

Uma outra forma de transmissão, de importância epidemiológica que também necessita de vigilância permanente, é através da transfusão de sangue. Mesmo se empregando 2 testes de princípios metodológicos diferentes para o diagnóstico ou para a triagem de sangue em bancos de sangue, como preconizado pela OMS, o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* ainda é complexo. Para termos uma idéia, no Brasil são realizadas cerca de 2.800.000 doações por ano. Para uma prevalência de 1% de soropositividade para o *T. cruzi*, estima-se a coleta de 28.000 unidades não-negativas, das quais 20% (6.048) são confirmadamente positivas e 80% (22.000) apresentam resultados inconclusivos ou indeterminados. Considerando-se que a sensibilidade média dos testes disponíveis seja de 99%, prevê-se que 61 unidades sejam falsamente classificadas como negativas. Assim, para um índice de fracionamento de 2,0 existe o risco de 122 unidades falso-negativas serem transfundidas anualmente (ANDRADE, 2000).

Por outro lado, o percentual de inaptidão clínica em torno de 20 a 30%, pode estar refletindo critérios muito rigorosos na triagem clínica e/ou na necessidade de incentivar a doação fidelizada. Assim, a inaptidão sorológica variando entre 9,25% no Sudeste e 26,77% na região Norte decorre, principalmente, da baixa especificidade das técnicas utilizadas (ANDRADE, 2000).

Esses fatos nos conduziram a elaborar o presente trabalho onde comparamos o desempenho do “kit” EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos (ELISA-Rec) frente

ao ELISA-Con e ao teste de HAI, com o objetivo de estabelecer a combinação de dois testes que pudessem eliminar ou reduzir o número de resultados inconclusivos, falso-negativos e falso-positivos. A escolha do ELISA-Rec deveu-se aos seguintes fatos: 1) no momento é o único "kit" que emprega antígenos recombinantes (CRA+ FRA) específicos do *T. cruzi*, comercialmente disponível; 2) os antígenos CRA+FRA e o referido "kit" foram desenvolvidos e patenteados por instituição brasileira - Biomanguinhos/FIOCRUZ; e 3) a sensibilidade e especificidade do ELISA-Rec foi previamente demonstrada. O ELISA-Rec identificou 100% dos indivíduos chagásicos (131/131) e não chagásicos (237/237) provenientes de áreas endêmicas de Pernambuco (GOMES *et al*., 2001). A escolha dos "kits" ELISA-Con da Meridian Diagnostics e HAI da Biolab-Mérieux deveu-se ao fato de os mesmos serem utilizados, para triagem sorológica para doença de Chagas em doadores na Fundação HEMOPE.

5.1. O desempenho do ELISA-Rec

No presente trabalho, a análise dos testes individuais revelou que cada teste (ELISA-Rec, ELISA-Con e HAI) apresentou 100% de especificidade. O teste de HAI identificou 59 dos 112 pacientes chagásicos, falhou em reconhecer 13 desses pacientes (reações falso-negativas) e produziu 40 reações inconclusivas. A sensibilidade do teste de HAI foi estimada em 52,7%. Já os ELISAs identificaram 110 dos 112 pacientes chagásicos e nenhuma reação inconclusiva foi observada. Os 2 casos não reagentes (falso-negativos) detectados em cada ELISA foram provenientes de diferentes pacientes (Tabela 8).

O fato de não termos obtido reações inconclusivas no ELISA-Rec e no ELISA-Con foi um resultado bastante satisfatório, sinalizando que a combinação desses dois

testes poderia diminuir o número de reações inconclusivas. As reações inconclusivas (35,7%) apresentadas pelo teste de HAI são preocupantes, uma vez que esse teste é amplamente usado para o diagnóstico e para triagem de doadores em unidades hemoterápicas.

De fato, quando combinamos o ELISA-Rec com o teste de HAI obtivemos 52 resultados inconclusivos e 1 resultado falso-negativo. A combinação do ELISA-Con- com o teste de HAI, também mostrou 51 resultados inconclusivos além de 2 falso-negativos (Tabela 7). Em banco de sangue, estes casos falso-negativos (3) teriam suas bolsas de sangue liberadas para transfusão sangüínea. Quando a combinação foi realizada com o ELISA-Rec e o ELISA-Con, constatamos que o número de resultados inconclusivos foi reduzido para 4, confirmando a sinalização dessa redução apontada no início das análises individuais de cada teste. Dentre estes 4 casos estavam presentes os 2 casos falso-negativos obtidos da combinação do ELISA-Con e do HAI, os quais foram reagentes quando testados pelo ELISA-Rec, como mostrado na Tabela 8. O fato dos mesmos terem identificados os antígenos do ELISA-Rec indica a infecção pelo *T. cruzi* devido à especificidade antigênica. Se em uma triagem sorológica utilizássemos o ELISA-Rec e o ELISA-Con, esses dois casos não teriam suas bolsas de sangue liberadas. Quanto aos outros dois casos, foram reagentes no ELISA-Con e não reagentes no ELISA-Rec. Também nesse caso, se ambos os ELISAs fossem utilizados em triagem sorológica, as bolsas de sangue desses casos não seriam liberadas.

Os 2 pacientes chagásicos que não apresentaram reatividade no ELISA-Rec, RN 28334 e 108558, indicam que o soro desses indivíduos não apresentava anticorpos contra os antígenos recombinantes CRA+FRA do ELISA-Rec. A reação desses indivíduos evidenciada pelo ELISA-Con apresentou uma DO elevada = 0,564 e 0,781

respectivamente, o que pode ser explicada pela mistura antigênica complexa presente nesse “kit”(antígenos purificados de *T. cruzi*).

A análise dos soros dos indivíduos portadores de outras doenças infecciosas e parasitárias (sífilis, HIV, HCV e LC) através da combinação do ELISA-Rec e ELISA-Con foram não reagentes. No entanto, a combinação de qualquer um dos ELISAs com o teste de HAI mostrou resultado inconclusivo devido à reação cruzada (falso-positiva) com sífilis, HCV e LC exibida pelo teste de HAI.

O desempenho do ELISA-Rec associado ao ELISA-Con concorre para impedir reações reações falso-negativas, falso-positivas e diminuir resultados inconclusivos.

5.2. A Problemática do teste de HAI

O problema que acomete a sorologia convencional, atualmente utilizada para diagnóstico da doença de Chagas e triagem de doadores em bancos de sangue, é o grande número de reações inconclusivas que são geradas, em função da dificuldade na interpretação da leitura do teste de HAI. Além disso, este teste apresenta a maior porcentagem de resultados falso-negativos, além dos resultados falso-positivos, provenientes de reações cruzadas com outras parasitoses, principalmente leishmania (SÁEZ-ALQUÉZAR *et al*., 1997). Devido à alta freqüência destas ocorrências, há a necessidade de serem feitas inúmeras retestagens, e como conseqüência, o aumento dos custos com material, mão-de-obra e tempo de execução, além da possibilidade de erros na manipulação. Apesar de tudo, muitas vezes não se chega a um resultado definido. Ou seja, o paciente sai de um laboratório com um resultado inconclusivo nas mãos, o que gera angústia e sérias consequências sociais, como por exemplo, a rejeição na hora de concorrer a uma vaga de trabalho. Em bancos de sangue, esse resultado indefinido leva

ao descarte, muitas vezes desnecessário, de bolsas de sangue. Além disso, devido à baixa sensibilidade deste teste, resultados falso-negativos são gerados, acarretando a transfusão de um sangue contaminado. Um outro fator limitante no teste de HAI é o uso do 2-mercaptoetanol, substância importante na reação porque evita reações inespecíficas, mas muito nociva à saúde.

A utilização de dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes, no caso o ELISA convencional associado a um ELISA que empregue antígenos recombinantes, visando a segurança transfusional e a redução de resultados inconclusivos que levam ao descarte desnecessários de bolsas de sangue e à angústia para os candidatos a doadores com provas sorológicas falso-positivas ou inconclusivas, foi uma das propostas feitas na XVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, realizada no ano de 2001, na cidade de Uberaba/MG. Resultados preliminares do presente trabalho foram apresentados nesta reunião, tendo sido agraciado com o prêmio Edmundo Chapadeiro como o melhor trabalho em diagnóstico da doença de Chagas. No ano de 2002, na XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, também em Uberaba, os resultados deste trabalho confirmaram os resultados apresentados anteriormente os quais serviram de base para que os "chagólogos" presentes na reunião elaborassem uma MOÇÃO, a qual foi lida publicamente em assembléia do Congresso, alertando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA para uma vigilância mais severa aos kits de diagnóstico.

5.3. Valor de comercialização dos "kits"

O teste de HAI tem um custo de U$ 0.23 por cada teste, o ELISA-Con custa U$ 1.47 por teste e o ELISA-Rec U$ 1.00 por teste. Aparentemente o teste de HAI é o mais

econômico, quando se leva em consideração o preço de custo por cada teste. Porém, a necessidade de restestagens em virtude dos resultados falso-positivos e falso-negativos, que quando associados ao ELISA-Con concorrem para o surgimento de resultados inconclusivos, além das amostras reagentes que segundo o fabricante devem ser quantificadas, termina por elevar os custos do teste de HAI. É importante ressaltar que os valores encontrados com relação à sensibilidade e à especificidade dos testes utilizados neste trabalho devem ser vistos também do ponto de vista de sua utilidade quando aplicados na rotina dos serviços, marcadamente nos bancos de sangue, que têm por finalidade precípua garantir a qualidade do sangue e dos hemoderivados utilizados em hemoterapia.

5.4. Problemas metodológicos

O principal problema encontrado foi alcançar o tamanho da amostra estimado, em virtude, principalmente, das características estabelecidas para os indivíduos casos, uma vez que a forma indeterminada não entrou no nosso estudo e esta é a forma na qual se concentra a maioria da população chagásica.

Um outro problema foi relacionado aos controles. Este justifica-se pela dificuldade de encontrar indivíduos que nunca tivessem sequer pernoitado em área endêmica para a doença de Chagas, visto que, em Pernambuco, apenas a Região Metropolitana é considerada área não-endêmica para esta doença (LEDEBOUR, C., comunicação pessoal).

6. CONCLUSÕES

A utilização de dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes, no caso ELISA convencional e ELISA recombinante, concorre para:

✒ a diminuição de resultados falso-negativos, que em banco de sangue levam à transfusão de sangue contaminado;

✒ a diminuição de resultados inconclusivos que minimizam as etapas de retestagens e o tempo de espera do sangue coletado, bem como os custos obtidos destas retestagens;

✒ a diminuição de resultados falso-positivos que podem produzir resultados erroneos em estudos epidemiológicos;

✒ a automação, que concorre para a obtenção de resultados mais seguros e mais rápidos.

7. RECOMENDAÇÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem a seguinte recomendação:

✒ utilização de dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes, um ELISA convencional e um ELISA recombinante, para o diagnóstico da doença de Chagas e triagem sorológica de doadores em banco de sangue.

8. Referências

ABATH FGC, NAKAZAWA M, PEREIRA VRA, ROSA DS, BARROS MNDS & GOMES YM. *Trypanosoma cruzi* excretory-secretory antigens are potentially useful for the serodiagnosis of chronic Chagas'disease as shown by preliminary ELISA evaluations. **Anais do XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology** p. 135, 2000.

AMATO NETO V, SHIKANAI-YASUDA MA. & AMATO VS. Doença de Chagas aguda In: DIAS JCP, COURA JR. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ p.127-133, 1997.

ANDRADE SG, MAGALHÃES JB & PONTES AL. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* com Benzonidazol e o Nifurtimox. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 22, p. 113-118, 1989.

ANDRADE Z. Relatório das Oficinas de trabalho da XVI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e IV Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmaniose. (Relatório de Reunião). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 33:619-623, 2000.

ANDRADE Z. Patologia e Patogenia. In: MALTA, J. **Doença de Chagas**. São Paulo, Sarvier p. 27-38, 1996.

BARROS, MNDS. Avaliação do Transudato da Mucosa Oral em Teste Imunoenzimático para o Diagnóstico da Doença de Chagas. **Tese de Mestrado**, Universidade de São Paulo 121 p, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Doença de Chagas. Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. **Série TELELAB** 71 p, 1998.

CANÇADO JR. Tratamento específico. In: Chuster M. **Cardiopatia Chagásica**, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985.

FERREIRA AW & ÁVILA SLM. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e parasitárias.** Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição, 443 p., Rio de Janeiro, 2001.

GOLDENBERG S, KRIEGER MA, LAFAILLE JJ, ALMEIDA E & OELEMANN W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas`disease. **Memórias do Instituto Butantan** *53*: 71-76, 1991.

GOMES YM, PEREIRA VRA, NAKAZAWA M, ROSA DS, BARROS MNDS, FERREIRA AGP, SILVA ED, OGATTA SF, KRIEGER MA & GOLDENBERG S. Serodiagnosis of chronic Chagas Infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96(4):497-501, 2001.

GOMES YM. Diagnóstico Etiológico. In: **Doença de Chagas**. MALTA, J. (Organizador), Sarvier, Rio de Janeiro cap. VII, p. 119 – 132, 1996.

GOMES YM. PCR and sero-diagnosis in chronic Chagas'disease: biotechnological advances. **Applied Biochemistry and Biotechnology** *66*: 107-119, 1997.

KRIEGER MA, ALMEIDA E, OELEMANN W, LAFAILLE JJ, PEREIRA JB, CARVALHO MR & GOLDENBERG S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas´disease. **American Journal Tropical Medicine of Hygiene** *46*: 427-434, 1992.

KRIEGER MA, SALLES JM, ALMEIDA E, LINSS J, BONALDO MC & GOLDENBERG S. Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Experimental Parasitology** *70*: 247-254, 1990.

LAFAILLE JJ, LINSS J, KRIEGER MA, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W & GOLDENBERG S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular Biochemical Parasitology** *35*: 127-136, 1989.

LUQUETTI A, RASSI A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener, S., Andrade, Z., Barral-Neto, M. (orgs.) **Trypanosoma cruzi e**

doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan cap.17, p. 344-378, 2000.

NAKAZAWA N, ROSA D, PEREIRA VRA, MOURA MO, FURTADO VC, SOUZA WV, BARROS MNS, ABATH FGC & GOMES YM. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas'disease. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology** 8:1024-1027, 2001.

OLIVEIRA JR. Forma indeterminada da doença de Chagas. Implicacões médico-trabalhistas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 54 (2) : 89-91, 1991.

PAN AA & PRAT DM. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of a 83-kilodalton amastigote protein. **Journal of Immunology** 143: 1001-1008, 1989.

SCHARFSTEIN J, SCHECHTER M, SENNA M, PERALTA JM, MENDONÇA-PREVIATO L. & MILES MA. *Trypanosoma cruzi* characterization and isolation of a 57/51,000 m.v. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **Journal of Immunology** 137: 1336-1341, 1986.

SCOTT MT & SNARY D. American Trypanosomiais (Chagas' disease). In : COHEN S & WARREN (eds). Immunology of parasitic infections, 2ed. Oxford : **Blackwell Scientific Publications** pp. 261-298, 1982.

SILVA ED, PEREIRA, VA, GOMES JAS, LORENA VMB, CANÇADO JR, FERREIRA AGP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, CORREA-OLIVEIRA R & GOMES YM. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to Monitor Cure of Human Chagas' Disease. **Journal Clinical Laboratory Analysis** 16:132-136, 2002.

SILVEIRA JF, UMEZAWA ES & LUQUETTI AO. Chagas' disease : recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology** p. 286-291, 2001.

STOLF MAS. *Trypanosoma cruzi* antigen in serodiagnosis. In: WENDEL, S, et al. (eds.) Chagas´disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and

clinical medicine. São Paulo: **International Society of Blood Transfusion Brazil'92** p. 195-205, 1992.

UMEZAWA ES, BASTOS S, CAMARGO ME, YAMAUCHI LM, SANTOS MR, GONZALEZ A, ZINGALES B, LEVIN MJ, SOUSA O, RANGEL-ALDAO R & SILVEIRA JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology** *37*: 1554-1560, 1999.

UMEZAWA ES, NASCIMENTO MS, KERSPER JR N, COURA JR, BORGES-PEREIRA J, JUNQUEIRA ACV & CAMARGO ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas'disease. **Journal of Clinical Microbiology** *34*: 2143-2147, 1996.

VOLLER A, DRAPER C & BIDWELL DE, *et al*. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **Lancet** 22 : 6-13, 1975.

WHO. Chagas disease: multi-governamental strategies. (www.who.int.tdr.research.progress9900/partnership/chagas.html) [capturado em 22/07/2002].

WHO-World Health Organization. Control of Chagas Disese.p 38-42, 1991

WHO-World Health Organization. Control of Tropical disease. Chagas' disease. A disease whose days are numbered, 16 pp, 1996.

ZINGALES B, GRUBER A, RAMALHO CB, UMEZAWA ES. & COLLI W 1990. Use of recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** *85*: 519-522.

“Consentimento Informado”

Título Projeto: Avaliação da eficácia do kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos no diagnóstico da Doença de Chagas, frente aos testes clássicos de Hemaglutinação e ELISA convencional.

Objetivo: Comparar o desempenho do kit EIE-Recobinante-Chagas-Biomanguinhos, com as técnicas de hemaglutinação indireta e ELISA convencional, utilizados na triagem de doadores de sangue.

Metodologia: Será coletado sangue por punção venosa no antebraço, através de um tubo vacuntainer estéril.

Riscos: Todo procedimento para coleta de sangue será realizado com material estéril descartável, podendo ser considerado um procedimento isento de riscos.

Benefícios: A utilização do kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos na triagem de doadores em Unidades Hemoterápicas (bancos de sangue), visa obter resultados mais seguros e mais rápidos, diminuindo os riscos de transmissão da doença por via transfusional, bem como o número de casos inconclusivos.

Desta forma, eu, _____,
RG n° _____, expedido por _____,
Abaixo assinado, atesto que entendi o conteúdo deste consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade participar desse estudo. E que esclareci todas as minhas dúvidas com a Dra. Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti (UPE) ou Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho (CPqAM), médicos responsáveis pela avaliação clínica dos pacientes.

_____ data: ____/____/____
Assinatura do Paciente

_____ data: ____/____/____
Testemunha

_____ data: ____/____/____
Assinatura do Médico Responsável

FORMULÁRIO DE PESQUISA
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Projeto: Avaliação da Eficácia do Kit Eie-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos para Diagnóstico Sorológico da Doença de Chagas Frente aos Testes Clássicos de Hemaglutinação e ELISA Convencional
Responsável: Dra. Yara Gomes e Andréa Gadelha

Coleta nº .....

Nome: .....

Idade: ..... **DN** ...../...../..... **Sexo: ( ) F ( ) M**

Endereço: .....

Natural: .....

Escolaridade:.....**Profissão:**.....

Estado Civil:.....

Sintomas: (/) dispnéia/tempo (/)edema de MMII/tempo

(/)tosse/tempo (/)dor torácica/tempo (/) síncope/tempo

(/ /)constipação/tempo/duração de dias (/) disfagia/tempo

Parentes portadores da doença de Chagas? ( )Sim ( )Não

Parentesco .....

Outros passados mórbidos? ( )Câncer ( )Esquitossomose ( )AIDS( )AVC

( )Leshmaniose ( )Tuberculose ( )Hanseníase ( )HAS

Cirurgia: .....

Já tomou transfusão de sangue ou hemoderivados? ( )Sim ( )Não

Conhece o barbeiro? ( )Sim ( )Não **Já foi picado?** ( )Sim ( )Não

<u>Sorologia para Chagas Positiva:</u> Data .....( )IMF ( )ELISA ( )HAI ( )FC

Diagnóstico da forma clínica: .....

Observações:.....

.....

Medicação: .....

Coleta Soro data/hora: .....

Tempo de Transporte no Gelo: .....

Resultado:..HAI ( ), ELISA-Con ( ), ELISA-Rec ( )

FORMULÁRIO DE PESQUISA

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Projeto: Avaliação da Eficácia do Kit Eie-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos para Diagnóstico Sorológico da Doença de Chagas Frente aos Testes Clássicos de Hemaglutinação e ELISA Convencional

Responsável: Dra. Yara Gomes e Andréa Gadelha

Coleta nº..2-.....

Nome: .....

Idade: ..... DN ...../...../..... Sexo: ....M ( ) F ( )...... .....

Endereço: .....

Natural: .....

Escolaridade:.....**Profissão:**.....

Estado Civil:.....

Já tomou transfusão de sangue ou hemoderivados? ( )Sim ( )Não

Já morou em zona endêmica? ( ) Sim ( )Não

Coleta Soro data/hora: .....

Resultado:..HAI ( ), ELISA-Con ( ), ELISA-Rec ( )

ANEXO 3

COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

Projeto

"Avaliação da eficácia do kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos para o diagnóstico da doença de Chagas, frente aos testes clássicos de hemaglutinação indireta e ELISA convencional"

Coordenador: Yara de Miranda Gomes
Depto. de Imunologia/CPqAM

PARECER

A Comissão considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96, e complementares.

Recife, 19 de setembro de 2001

Nilma Cintra Leal
Coordenador

Anexo 4 – Avaliação sorológica dos indivíduos chagásicos (casos) através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de HAI

Paciente No.	Registro No.	Forma Clínica	ELISA-Rec[a]	ELISA-Con[b]	HAI		
			DO	DO	QL	RT	QT
1	133995	FC	1,349	1,703	R	R	1:40
2	106422	FC	1,172	1,578	I	I	-
3	106673	FC	1,038	1,560	I	R	1:40
4	71321	FC	1,198	1,600	R	R	1:2560
5	51624	FC	1,343	1,420	R	R	1:160
6	103255	FC	0,522	1,376	I	R	1:40
7	573320	FC	1,168	1,491	R	R	1:160
8	127612	FC	0,797	1,445	I	I	-
9	**122138**	**FCA**	**0,412**	**1,271**	**I**	**NR**	**-**
10	85558	FC	1,229	1,569	R	R	1:2560
11	**110793**	**FC**	**0,400**	**1,442**	**I**	**NR**	**-**
12	74651	FCA	1,034	1,404	I	I	-
13	96361	FM	1,193	1,322	R	R	1:640
14	118317	FM	1,013	1,537	R	R	1:320
15	57628	FCA	1,076	1,472	R	R	1:1280
16	50718	FC	0,863	1,577	R	R	1:160
17	28341	FC	0,893	1,524	R	R	1:1280
18	123923	FC	0,837	1,441	I	I	-
19	124543	FC	1,289	1,549	R	R	1:1280
20	51809	FC	0,737	1,205	R	R	1:160
21	125935	FC	1,291	1,451	R	R	1:1280
22	26389	FM	0,972	1,425	R	R	1:640
23	35085	FC	1,143	1,380	I	I	-
24	104348	FC	1,015	1,481	R	R	1:640
25	123478	FC	1,162	1,580	R	R	1:1280
26	117047	FC	1,157	1,518	R	R	1:640
27	72379	FC	0,891	1,540	R	R	1:2560
28	MRS	FD	0,840	1,548	R	R	1:320
29	121776	FCA	1,003	1,597	R	R	1:1280
30	125291	FC	0,718	1,445	I	I	-
31	79937	FM	1,030	1,564	I	R	1:320
32	83028	FC	1,038	1,533	R	R	1:320
33	134893	FC	0,743	1,382	R	R	1:160
34	42701	FC	1,127	1,440	R	R	1:1280
35	153625	FC	0,691	1,244	R	R	1:40
36	120099	FC	1,260	1,422	R	R	1:320
37	118113	FC	1,032	1,470	R	R	1:160
38	77188	FC	0,921	1,407	R	R	1:1280
39	70371	FC	1,432	1,440	R	R	1:40
40	100481	FC	0,226	1,546	R	R	1:320

Anexo 4 - Continuação

41	55657	FC	1,296	1,517	R	R	1:640
42	22702	FCA	0,584	1,396	R	R	1:80
43	149447	FC	1,096	1,423	R	R	1:320
44	54709	FC	1,101	1,342	R	R	1:1280
45	106560	FC	1,270	1,404	I	I	-
46	87214	FC	1,595	0,653	I	I	-
47	106448	FCA	1,811	0,889	I	R	1:640
48	102169	FC	1,706	0,863	I	I	-
49	128873	FC	1,996	0,854	I	R	>1:5120
50	**70139**	**FC**	**2,037**	**0,627**	**NR**	**NRT**	**-**
51	124748	FC	0,841	0,600	I	I	-
52	66872	FC	1,793	0,913	I	I	-
53	38837	FC	1,724	0,916	I	I	-
54	114961	FC	1,690	0,640	R	R	1:80
55	75822	FC	1,863	0,810	I	I	-
56	125118	FC	1,945	0,806	I	I	-
57	128876	FD	2,071	0,893	R	R	1:640
58	54437	FC	1,785	0,887	R	R	1:640
59	132550	FCA	2,032	0,854	I	I	-
60	104209	FC	1,772	0,791	I	R	1:40
61	135959	FC	1,936	0,880	I	I	-
62	99228	FC	1,552	0,718	I	I	-
63	6577	FC	1,747	0,807	R	R	1:5120
64	**128874**	**FC**	**1,949**	**0,802**	**NR**	**NRT**	**-**
65	67293	FC	1,815	0,646	I	I	-
66	67737	FD	2,145	0,853	R	R	1:1280
67	31981	FC	1,641	0,540	I	I	-
68	54615	FC	1,944	0,847	I	R	1:40
69	106407	FC	2,035	0,890	R	R	1:320
70	0101	FC	1,953	0,763	I	I	-
71	0501	FCA	1,638	0,752	I	R	1:40
72	2701	FD	2,151	0,851	I	R	1:40
73	5101	FC	1,835	0,794	I	I	-
74	5106	FC	1,883	0,798	I	I	-
75	5602	FC	1,688	0,599	I	I	-
76	6001	FC	1,850	0,830	R	R	1:640
77	6302	FC	1,632	0,782	I	R	1:40
78	6304	FC	1,951	0,815	I	I	-
79	6401	FC	1,452	0,590	I	I	-
80	6702	FCA	1,778	0,760	R	R	1:320
81	**7202**	**FC**	**1,464**	**0,553**	**NR**	**NRT**	**-**
82	**100-01**	**FC**	**1,635**	**0,661**	**NR**	**NRT**	**-**
83	109-01	FCA	2,212	0,667	I	I	-
84	FJS	FM	1,605	0,916	I	R	1:1280
85	EG	FCA	1,404	0,628	I	I	-

Anexo 4 – Continuação

86	DDC	FC	1,730	0,889	I	R	1:2560
87	128582	FD	1,606	0,835	R	R	1:40
88	106520	FC	1,550	0,635	R	R	1:40
89	1001	FD	1,723	0,646	R	I	1:40
90	Ch 002	FC	1,611	0,838	R	R	1:640
91	Ch 003	FC	1,914	0,868	I	I	-
92	Ch 004	FC	1,627	0,897	I	I	-
93	Ch 005	FC	1,628	0,788	I	I	-
94	**Ch 006**	**FC**	**1,431**	**0,706**	**NR**	**NRT**	**-**
95	**Ch 007**	**FC**	**1,511**	**0,481**	**NR**	**NRT**	**-**
96	**Ch 008**	**FC**	**1,655**	**0,581**	**NR**	**NRT**	**-**
97	Ch 009	FC	1,636	0,898	I	I	-
98	Ch 010	FC	1,584	0,767	I	I	-
99	Ch 011	FC	1,734	0,761	I	I	-
100	Ch 012	FC	1,842	0,853	I	I	-
101	Ch 013	FC	1,852	0,908	I	I	-
102	**Ch 015**	**FC**	**1,239**	**0,350**	**NR**	**NRT**	**-**
103	Ch 016	FCA	1,342	0,545	I	I	-
104	Ch 001	FD	1,825	0,669	I	I	-
105	**133284**	**FCA**	**1,385**	**0,361**	**R**	**NR**	**-**
106	127617	FC	1,325	0,979	R	R	1:160
107	1116239	FD	0,320	0,786	I	I	-
108	61199	FD	1,673	0,891	R	R	1:320
109	**48874**	**FC**	**1,143**	**0,666**	**I**	**NR**	**-**
110	**28334**	**FCA**	**0,080**	**0,564**	**I**	**NR**	**-**
111	**108558**	**FCA**	**0,092**	**0,781**	**R**	**R**	**1:40**
112	75708	FC	0,703	0,920	R	I	-

a – No ELISA-Rec foram utilizadas três placas, com os seguintes pontos de corte: 0,161; 0,162; 0,171. **b** – No ELISA-Con foram utilizadas três placas, com os seguintes pontos de corte: 0,848; 0,459; 0,462.

DO = Densidade Óptica; QL = Qualitativo; QT = Quantitativo; RT = Retestagem; FC = Forma Cardíaca; FD = Forma Digestiva; FM = Forma Mista; FCA = Forma Cardíaca Assintomática; R = Reagente; NR = Não Reagente; NRT = Soro Não Retestado I = Inconclusivo; - = Soro Não Titulado.

Observação: Os pacientes destacados em negrito apresentaram resultados falso-negativos no teste de HAI e estão mostrados na Tabela 8.

Anexo 5 - Avaliação sorológica dos indivíduos não-chagásicos (controles) através do ELISA-Rec, ELISA-Con e do teste de HAI

Paciente No.	Registro No.	ELISA-Rec[a]	ELISA-Con[b]	HAI
		DO	DO	QL
1	2-001	0,066	0,214	NR
2	2-002	0,065	0,182	NR
3	2-003	0,081	0,204	NR
4	2-004	0,061	0,195	NR
5	2-005	0,071	0,255	NR
6	2-006	0,062	0,213	NR
7	2-007	0,055	0,179	NR
8	2-008	0,066	0,236	NR
9	2-009	0,057	0,212	NR
10	2-010	0,065	0,193	NR
11	2-011	0,060	0,187	NR
12	2-012	0,067	0,239	NR
13	2-013	0,060	0,259	NR
14	2-014	0,057	0,225	NR
15	2-015	0,055	0,217	NR
16	2-016	0,066	0,227	NR
17	2-017	0,068	0,179	NR
18	2-018	0,077	0,258	NR
19	2-019	0,062	0,206	NR
20	2-020	0,063	0,195	NR
21	2-021	0,058	0,192	NR
22	2-022	0,054	0,207	NR
23	2-023	0,058	0,196	NR
24	2-024	0,062	0,219	NR
25	2-025	0,083	0,227	NR
26	2-026	0,064	0,196	NR
27	2-027	0,059	0,330	NR
28	2-028	0,066	0,211	NR
29	2-029	0,063	0,180	NR
30	2-030	0,055	0,227	NR
31	2-031	0,089	0,180	NR
32	2-032	0,074	0,219	NR
33	2-033	0,067	0,191	NR
34	2-034	0,062	0,268	NR
35	2-035	0,054	0,129	NR
36	2-036	0,060	0,118	NR
37	2-037	0,066	0,095	NR
38	2-038	0,059	0,126	NR

Anexo 5- Continuação

39	2-039	0,062	0,059	NR
40	2-040	0,056	0,037	NR
41	2-041	0,092	0,063	NR
42	2-042	0,065	0,032	NR
43	2-043	0,060	0,105	NR
44	2-044	0,082	0,074	NR
45	2-045	0,063	0,102	NR
46	2-046	0,054	0,050	NR
47	2-047	0,060	0,040	NR
48	2-048	0,053	0,097	NR
49	2-049	0,062	0,063	NR
50	2-050	0,065	0,046	NR
51	2-051	0,057	0,045	NR
52	2-052	0,057	0,049	NR
53	2-053	0,059	0,060	NR
54	2-054	0,053	0,076	NR
55	2-055	0,073	0,059	NR
56	2-056	0,056	0,043	NR
57	2-057	0,062	0,062	NR
58	2-058	0,130	0,048	NR
59	2-060	0,062	0,071	NR
60	2-061	0,057	0,060	NR
61	2-062	0,059	0,031	NR
62	2-063	0,060	0,049	NR
63	2-064	0,061	0,029	NR
64	2-065	0,054	0,038	NR
65	2-066	0,061	0,041	NR
66	2-067	0,077	0,080	NR
67	2-068	0,057	0,138	NR
68	2-069	0,056	0,067	NR
69	2-070	0,061	0,031	NR
70	2-071	0,053	0,045	NR
71	2-072	0,058	0,082	NR
72	2-074	0,051	0,082	NR
73	2-075	0,071	0,017	NR
74	2-076	0,079	0,118	NR
75	2-077	0,089	0,059	NR
76	2-078	0,065	0,079	NR
77	2-079	0,064	0,075	NR
78	2-080	0,061	0,094	NR
79	2-081	0,065	0,020	NR
80	2-082	0,060	0,095	NR
81	2-083	0,068	0,037	NR
82	2-084	0,062	0,036	NR

Anexo 5- Continuação

83	2-085	0,062	0,050	NR
84	2-086	0,056	0,041	NR
85	2-087	0,065	0,060	NR
86	2-088	0,061	0,089	NR
87	2-089	0,056	0,054	NR
88	2-090	0,055	0,079	NR
89	2-091	0,068	0,037	NR
90	2-092	0,125	0,222	NR
91	2-093	0,057	0,033	NR
92	2-094	0,063	0,060	NR
93	2-096	0,062	0,078	NR
94	2-097	0,061	0,048	NR
95	2-098	0,141	0,046	NR
96	2-099	0,059	0,039	NR
97	2-100	0,067	0,033	NR
98	2-101	0,063	0,044	NR
99	2-102	0,060	0,051	NR
100	2-103	0,063	0,079	NR
101	2-104	0,058	0,073	NR
102	2-105	0,053	0,039	NR
103	2-106	0,055	0,033	NR
104	2-107	0,054	0,199	NR
105	2-108	0,072	0,115	NR
106	2-109	0,105	0,069	NR
107	2-110	0,095	0,038	NR
108	2-111	0,055	0,057	NR
109	2-112	0,058	0,045	NR
110	2-113	0,059	0,032	NR
111	2-114	0,060	0,041	NR
112	2-115	0,094	0,052	NR
113	2-116	0,071	0,049	NR
114	2-117	0,107	0,036	NR
115	2-118	0,058	0,033	NR
116	2-119	0,061	0,035	NR
117	2-120	0,061	0,086	NR
118	2-121	0,056	0,055	NR
119	2-122	0,060	0,053	NR
120	2-123	0,059	0,108	NR
121	2-124	0,062	0,059	NR
122	2-125	0,061	0,061	NR
123	2-126	0,059	0,059	NR
124	2-127	0,056	0,038	NR
125	2-128	0,115	0,076	NR
126	2-129	0,058	0,028	NR
127	2-130	0,059	0,039	NR

Anexo 5- Continuação

128	2-131	0,057	0,020	NR
129	2-132	0,098	0,065	NR
130	2-133	0,061	0,058	NR
131	2-134	0,066	0,074	NR
132	2-135	0,060	0,106	NR
133	2-136	0,128	0,017	NR
134	2-137	0,094	0,076	NR
135	2-138	0,059	0,030	NR
136	2-139	0,060	0,031	NR
137	2-140	0,064	0,014	NR
138	2-141	0,077	0,029	NR
139	2-143	0,065	0,031	NR
140	2-144	0,066	0,052	NR
141	2-145	0,068	0,035	NR
142	2-146	0,060	0,029	NR
143	2-147	0,055	0,026	NR

a – No ELISA-Rec foram utilizadas três placas, com os seguintes cut-offs: 0,161; 0,162; 0,171. **b** – No ELISA-Con foram utilizadas três placas, com os seguintes limites superiores e inferiores: 0,848 e 0,763; 0,459 e 0,413; 0,462 e 0,416, respectivamente.

QL- Qualitativo; NR – Não Reagente; DO – Densidade Óptica.

XVII REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS E V REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES

A Comissão Científica da XVII REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGASE V REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, concede o prêmio "Edmundo Chapadeiro" na área temática de "Diagnóstico e Tratamento" ao tema livre " **Diagnóstico da doença de Chagas: avaliação do 'kit' EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos frente aos testes de hemaglutinação e ELISA**", considerado o melhor trabalho apresentado, pelo que acrescenta ao conhecimento nessa área.

A Coordenação da Reunião parabeniza os autores: **Andréa A. Monteiro Gadelha, Alinne Fernanda A.Verçosa, Virgínia Maria B. Lorena, Mineo Nakazawa, Maria das Neves D.S. Barros, Edimilson D. Silva, Antonio Gomes P. Ferreira, Marcos A. Krieger, Samuel Goldenberg, Alexandre B. Carvalho, Wayner V. Souza e Yara M. Gomes.**

Uberaba, 28 de outubro de 2001

Dr. Antônio Carlos Silveira
Coordenador

25 a 28 de outubro de 2001
Uberaba (MG)

COORDENADOR
Antônio Carlos Silveira

COMISSÃO ORGANIZADORA
Abigail Rosa Prata
Carlos Caio Prates de Loiola
Edson Rua Lemos
Fabiano Pimenta Júnior
Hardion Veloso Silveira Neto
Luis Gerlando Castellanos
Nunzia de Oliveira Macedo

COMISSÃO CIENTÍFICA
Alejandro Luquetti Gontijo
Ana Cícia Telles Rabello
Dalmo Correia Filho
Tiida Barbara Furtado Vieira
Gustavo Adolfo S Romero
João Carlos Pinto Dias
Lilian Diotaiuti
Reynaldo Dietze

EQUIPE DE APOIO
Cleobaldo Matos
Daiwi Pereira da Silva
Ginura Lima
João Luiz Carvalho
Liliani da Luzz
Maria da Guia de O Gomes
Regina Borges
Regina Moreira

Informações:
Núcleo de Medicina Tropical
Universidade de Brasília
CP 4517 CEP 70.919-970
Brasília (DF) Brasil
Fone: (61) 273.5009
FAX: (61) 273.2811

HP
www.unb.br/fs/nchagas

E-mail
tropical@unb.br

Diagnóstico da doença de chagas: avaliação do "kit" EIE-recombinante-chagas-biomanguinhos frente aos testes clássicos de hemaglutinação indireta e elisa convencional

Aluno: Andréa Átiço Monteiro Gadelha
Orientadores: Yara de Miranda Gomes, Wayner Vieira de Souza
Ano de Ingresso: 2001
Área: Epidemiologia, Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos
Resumo:

Apesar dos avanços alcançados no controle da transmissão natural da doença de Chagas, uma outra forma de transmissão de importância epidemiológica é através da transfusão de sangue. O aumento da segurança do receptor do sangue doado e a redução de resultados inconclusivos, que levam ao descarte desnecessário de bolsas, devem ser prioridades quando se fala na escolha de um conjunto de diagnósticos ("kit") de melhor desempenho para ser usado na triagem de doadores de sangue.

Um "kit" para diagnóstico da doença de Chagas, produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ, o EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos (EIE-Rec) tem sido avaliado por vários grupos de pesquisa. Além da elevada sensibilidade e especificidade o EIE-Rec apresenta vantagens como: (i) a utilização de antígenos recombinantes de T. cruzi evitam reações falso-positivas; (ii) o ELISA direto aumenta a sensibilidade do método permitindo a avaliação de soro com baixo título, e corrobora sua especidade; (iii) a utilização de amostras de soro não diluídas reduz a possibilidade de erro devido a manipulação; (iv) o procedimento é rápido (2 horas), fácil de realizar e de baixo custo. Estes fatos indicam que o EIE-Rec poderia ser empregado na triagem de doadores em Unidades Hemoterápicas. Para isso um estudo comparativo com os testes convencionais (HAI, IFI e ELISA) se faz necessário. A proposta do presente trabalho é analisar o desempenho do kit EIE-Rec frente aos testes HAI e ELISA convencional atualmente os mais utilizados na triagem de doadores de sangue.

Os soros utilizados serão coletados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Oswaldo Cruz (UPE) e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, situados em Recife-PE. Serão considerados casos, indivíduos com sinais e sorologia que caracterizam a fase crônica da doença, apresentando ou não sintomas. Serão considerados controles, indivíduos que nunca receberam transfusão de sangue e nem habitaram em área endêmica. As amostras serão testadas pelo ELISA-con, HAI e EIE-Rec, conforme o protocolo dos seus fabricantes: Meridian, Biolab e Biomanguinhos, respectivamente, para posterior análise comparativa. A amostra foi desenhada por estimação de duas proporções. Dessa forma, serão selecionados 250 indivíduos categorizados como casos, e, 250 indivíduos categorizados como controles. O estudo foi submetido aos Comitês de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ e da UPE.

Palavras-chaves: Imunodiagnóstico, Doença de Chagas, Trypanosoma cruzi
Suporte: Biomanguinhos/FIOCRUZ
E-mail: andreagad@yahoo.com.br

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
34(Suplemento III), 2001.

XVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas
V Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses

Métodos: A ICr foi definida como a incapacidade de se atingir pelo menos 80% da freqüência cardíaca máxima para a idade (FCmáx=220-idade). Dezessete pacientes (9,9% do total) apresentaram ICr. Características da resposta ao TE, Holter e Ecocardiograma foram comparadas entre pacientes sem ICr e aqueles com ICr. **Resultados:**

Variável	ICr -	ICr +	p
BRD (%)	25,2	58,8	0,008
>10EV/h (%)	38,2	76,4	0,005
FEVE eco	58,1	57,5	0,826
MVO2 TE	45,4	35,0	0,000
Dif Pas TE	46,4	25,8	0,000

Conclusões: A ICr é um marcador de arritmia e da diminuição da capacidade de esforço nos pacientes chagásicos, mas não se correlacionou com a redução da fração de ejeção. As implicações prognósticas da ICr na dCh precisam ser avaliadas em estudos prospectivos.

Financiado por CNPq, PrPqUFMG e FAPEM

I.11

DOENÇA DE CHAGAS: RELATO DE CASO NA FASE AGUDA. R.L. Rocha, A.L.L. Rocha; L.L. Rocha. Faculdade de Medicina da UFMG, Hospital das Clínicas UFMG, Infectologia Pediátrica.

Identificação: D.I.A. 9a 11m, masculino, feodérmico, natural e residente em Santa Maria do Suaçui / MG (zona rural).**Relato do caso:** criança admitida no Hospital das Clínicas em 22/11/00 com história de febre elevada e contínua (não aferida), hiporexia, mal-estar geral, astenia, dor abdominal, edema facial e dos membros inferiores de duas semanas de evolução. À admissão apresentava-se febril, prostrado, com edema facial acometendo lábios e pálpebras bilateralmente, escroto e pernas, linfadenomegalia discreta, hepatoesplenomegalia leve a moderada, sopro sistólico panfocal II/ VI Levine e PA=90/60 mmHg. Evoluiu com febre, aumento da hepatoesplenomegalia, presença de ascite, derrames pleural e pericárdio. Em 03/12/00 houve piora geral do quadro clínico, com instabilidade hemodinâmica sendo transferido ao CTI/ HC, evoluindo com miocardite grave, insuficiência cardíaca, choque cardiogênico e morte em 07/12/00. O 1º estudo ecocardiográfico (28/11) mostrava câmaras cardíacas normais com função contrátil preservada, valvas normais, derrame pericárdico moderado, pericárdio de morfologia normal, ausência de fibrina e/ou de restrição diastólica. Ecocardiogramas seqüenciais mostraram dilatação progressiva das câmaras cardíacas, hipertrofia ventricular, hipocontratilidade miocárdica, movimento paradoxal do septo interventricular com função sistólica de VE gravemente comprometida. Sorologia para *T. cruzi* (hemaglutinação e imunoensaio em partículas de gel –Pagia- positivos). Embora sem confirmação parasitológica (não realizada) o quadro clínico e a evolução são compatíveis com a fase aguda da doença de Chagas. Esta hipótese diagnóstica deve ser aventada em pacientes com o quadro descrito, procedente de zona endêmica para Chagas e nos quais outras possíveis etiologias tenham sido afastadas.

I.12

DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS: AVALIAÇÃO DO "KIT" EIE-RECOMBINANTE-CHAGAS-BIOMANGUINHOS FRENTE AOS TESTES DE HEMAGLUTINAÇÃO E ELISA. A.A.M. Gadelha, A.F.A Verçosa, V.M.B. Lorena, M. Nakazawa, M.N.D.S. Barros, E.D. Silva, A.G.P. Ferreira, M.A. Krieger, S. Goldenberg, A.B. Carvalho, W.V. Souza e Y.M. Gomes. CPqAM/FIOCRUZ, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e UPE.

O aperfeiçoamento dos métodos sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas e para a triagem de doadores em unidades hemoterápicas que aumentem a segurança do receptor e a redução de resultados inconclusivos tem sido objeto de estudos de vários grupos de pesquisa. No presente trabalho, o desempenho do kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos (EIE-Rec), um ELISA direto que utiliza os antígenos recombinantes CRA e FRA associados, produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ, foi comparado com os testes de Hemaglutinação Indireta (HAI) e ELISA convencional (ELISA-Con). Os soros utilizados foram coletados no Ambulatório de doença

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
34(Suplemento III), 2001.

XVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas
V Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses

de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (UPE) e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ situados em Recife-PE. Foram considerados casos indivíduos com sinais e sorologia que caracterizam a fase crônica da doença, apresentando ou não sintomas. Foram considerados controles indivíduos que nunca receberam transfusão de sangue e nem habitaram em área endêmica. Oitententa e um soros (47 obtidos de indivíduos chagásicos e 34 de indivíduos não-chagásicos) foram analisados através dos testes de HAI, ELISA-Con e EIE-Rec conforme o protocolo dos seus fabricantes: Biolab, Meridian e Bio-Manguinhos, respectivamente. Os resultados mostraram que 100% (sensibilidade e especificidade=100%) dos indivíduos chagásicos e não-chagásicos foram reagentes e não reagentes, respectivamente, no EIE-Rec e no ELISA-Con. No HAI 13 indivíduos chagásicos (27,66%) apresentaram resultados inconclusivos (sensibilidade=72,34% IC 95%: 57,1%; 83,9%) sendo necessário a realização de nova testagem. Nesses casos o HAI exige mais uma etapa, aumentando o tempo de execução da técnica. Na retestagem 10 indivíduos (76,92%) continuaram a apresentar resultados inconclusivos. Com os indivíduos não-chagásicos os resultados obtidos no HAI foram concordantes com o EIE-Rec e ELISA-Con (100% foram não reagentes). A utilização de dois testes imunoenzimáticos com diferentes preparações antigênicas tem sido proposta para o diagnóstico e triagem de doadores de sangue. Dada a automação dos testes ELISA e dos resultados obtidos no presente trabalho o ELISA-Rec e o ELISA-Con poderiam ser empregados para o diagnóstico e triagem de doadores em unidades hemoterápicas. Os ensaios estão sendo repetidos com o aumento do tamanho da amostra.

Suporte financeiro: CPqAM/FIOCRUZ, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, CNPq

I.13

INDICAÇÕES E RESULTADOS DO XENODIAGNÓSTICO EM CHAGÁSICOS CRÔNICOS PROCEDENTES DE ZONA NÃO ENDÊMICA PARA DOENÇA DE CHAGAS. Maria Helena Proença de Moraes, Cíntia Tiemi Morita, Jamiro S. Wanderley, Vera Lúcia C.C. Rodrigues, Maria Elena Guariento, Eros Antonio de Almeida. Grupo de Estudos em Doença de Chagas-GEDoCh/FCM/UNICAMP – Campinas/SP e Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo – SUCEN – Secretaria de Saúde/SP

O Xenodiagnóstico continua sendo um dos únicos exames subsidiários capaz de realizar o diagnóstico de certeza da doença de Chagas, devido a sua especificidade.Todavia, a baixa sensibilidade e dificuldades técnicas inerentes ao método têm reduzido sua utilização. **Objetivo:** Apresentar as indicações e resultados do Xenodiagóstico realizados em chagásicos crônicos atendidos pelo Grupo de Estudos em Doença de Chagas-GEDoCh, residentes em região não mais endêmica para a doença de Chagas. **Metodologia:** O levantamento dos casos foi feito em arquivo do GEDoCh onde se cadastra os doentes que realizam o exame. Através dos prontuários clínicos conseguiu-se os seguintes dados: a indicação, o resultado, a naturalidade, a idade, o sexo, a raça, a forma clínica da doença de Chagas e efeitos colaterais do exame. O Xenodiagnóstico foi realizado por profissionais da SUCEN obdecendo os procedimentos habituais empregados na realização do exame, sendo a última leitura feita aos 90 dias. **Resultados:** 1)As indicações foram: contrôle de tratamento específco para a doença de Chagas em 40 casos(39,60%); imunossupressão em 25 casos(24,75%); sorologia convencional para doença de Chagas duvidosa em 13 casos(12,87%); evolução para outras formas clínicas da doença em 12 casos(11,88%); gravidez em 9 casos(8,90%); idade avançada em um caso(0,99%) e não informada em um caso(0,99%). 2)O exame foi positivo em 25% dos casos. 3) Foram naturais de zona endêmica 41 casos(40,59%), com predomínio de Minas Gerais(53,65%) e naturais do Estado de São Paulo 36 casos(35,64%). 4)A idade média foi de 42±17,03 anos, sendo a idade mínima de 4 e a máxima de 76 anos. 5)Quarenta e nove(49%) foram homens.6)Cinquenta e quatro(54%) foram brancos.7) A forma cardíaca ocorreu em 39 casos(38,69%); a indeterminada em em 27 casos(26,73%); megas em 10 casos(9,90%); forma aguda em 5 casos(4,95%), não havendo informações sobre a forma da doença em 28 casos(27,72%). 8)Efeitos colaterais ocorreram em apenas 3 casos e se relacionou a reação alérgica no local da aplicação das caixas, resolvendo espontâneamente ou com corticosteróide de uso tópico. **Conclusões:** 1)As principais indicações para o Xenodiagnóstico no GEDoCh visam a detecção de parasitemia onde esta é significante para se efetuar tratamento específico para a doença de Chagas, assim como controle de eficácia terapêutica. Também, em situações onde a parasitemia seja potencialmente maior e, estabelecer o diagnóstico da doença de Chagas, quando a sorologia convencional não é capaz de fazê-lo. 2)A positividade do exame e baixa. 3)A população a qual se submeteu ao exame e as formas clínicas da doença de Chagas não foram homogêneas.

I.14

AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS, FUNÇÃO E ESTRUTURA HEPÁTICA DE RATOS SOB O USO DE BENZNIDAZOL. Cíntia Tiemi Morita, Maria Helena Proença de Moraes Michiko Regina Ozaki, Jamiro da Silva Wanderley, Ilka FSF Boin, Eros Antonio de Almeida. Grupo de Estudos em Doença de Chagas-GEDoCh/Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP – Campinas –SP.

A terapêutica específica da doença de Chagas é pouco realizada uma vez que os medicamentos disponíveis e aceitos para este fim se limitam ao Benznidazol. Em um caso clínico observamos potencial efeito colestático desta droga.

foram injetados com PBS (pH 7,2) e os adjuvantes. **Resultados:** Os resultados mostraram que CRA e FRA induziram nos camundongos imunizados: 1) níveis elevados de anticorpos de isotipo IgG2a e IgG3; 2) hipersensibilidade imediata; 3) proliferação das células esplênicas. Além disso, a análise fenotípica da população de células esplênicas revelaram que o número de células T CD4+ produtoras de IFN-γ foi mais elevada em camundongos imunizados com CRA. **Conclusão:** a imunização com CRA e FRA ativa mecanismos imunes envolvidos na eliminação do parasita e sugerem que esses antígenos poderiam proteger contra a infecção por *T. cruzi.* Estas abordagens estão sendo avaliadas em camundongos imunizados e desafiados com *T. cruzi.*

Suporte: Biomanguinhos/Fiocruz C.C. 04/2000, CPqAM/Fiocruz, CNPq.

TL I.7

UTILIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FONTES ALIMENTARES DE *BELMINUS HERRERI* LENT & WYGODZISNKY, 1979 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE).

[1]Rosemere Duarte, [3]Claudia Magaly Sandoval, [3]Reinaldo Gutierrez, [3]Victor M. Angulo, [2] Dayse da Silva Rocha, [2]José Jurberg & [2]Cleber Galvão. [1]Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz; [2]Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. [3]Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander.

Introdução: Os recentes registros de *Belminus herreri* na Colômbia permitiram obter informações sobre o ciclo de vida, e alguns aspectos dos hábitos alimentares deste inseto sob condições de laboratório. Entretanto, ainda são carentes as informações a respeito de sua biologia e possibilidades de atuar como vetor do *Trypanosoma cruzi* em ambientes naturais.

Objetivos: Determinar fontes alimentares de *B. herreri* capturados em áreas provenientes do município de San Martin – Colômbia através do teste ELISA. Em paralelo, avaliar a possibilidade de infecção pelo *T. cruzi.*

Metodologia: Os exemplares capturados por busca ativa nos domicílios, foram levados ao laboratório, onde foram dissecados para pesquisa de flagelados e coleta de material intestinal para realização de PCR, para pesquisa de DNA de *T.cruzi* e identificação das fontes alimentares através do teste ELISA. Neste teste, as amostras diluídas a 1:25 em tampão, foram submetidas a antissoros contendo anticorpos capazes de identificar as proteínas de animais que poderiam atuar com fonte alimentar nos ambientes naturais (ave, cão, cabra, eqüino, gambá, gato, réptil, roedor e humano). Também foi utilizado antissoro anti-hemolinfa de Blatellidae (*Periplaneta americana*).

Resultados: Das 31 casas examinadas, em 4 (12.9%) foram capturados exemplares de *B. herreri* . O total de insetos capturados foi de 121, (86 adultos, 30 N5 e 5 N4), todos no interior dos domicílios. Quanto à pesquisa para *T. cruzi*, dos 44 exemplares examinados, nenhum apresentou positividade no exame direto, porém 4 (9,9%) apresentaram positividade pelo PCR. Com relação à fonte alimentar, entre os 76 exemplares analisados, 73 (96%) apresentaram positividade para Blatelidae e os 3 restantes foram negativos.

Conclusões: Observou-se que, habitações humanas são ambientes artificiais em que o *B. herreri* pode se adaptar. Quanto à preferência alimentar, ao que parece, este inseto é essencialmente predador em seu ambiente natural, embora também possa fazer hematofagia e cleptohematofagia como já observado em condições de laboratório. O método ELISA mostrou-se perfeitamente prático, sensível e específico e eficaz durante a realização deste estudo.

TL I.8

DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS: ANÁLISE COMPARATIVA DOS ELISAs RECOMBINANTE E CONVENCIONAL COM O TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO.

Andréa Ático Monteiro Gadelha[1*], Alinne Fernanda Amaral Verçosa[1], Virgínia Maria Barros de Lorena[1], Mineo Nakazawa[1], Wayner Vieira Souza[1], Alexandre Bezerra de Carvalho[1], Antonio Gomes Pinto Ferreira[2], Edimilson Domingos Silva[2], Marco Krieger[3,4], Samuel Goldenberg[3,4] & Yara de Miranda Gomes[1]. [1]CPqAM/Fiocruz, [2]Biomanguinhos/Fiocruz e [3]IOC/Fiocruz, [4]IBMP/PR. *Mestrado em Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz.

Introdução: A transfusão sanguínea é, atualmente, o principal meio de se adquirir a doença de Chagas na América Latina. A melhoria da qualidade nos procedimentos de hemoterapia tem levado vários grupos de pesquisa a se preocupar com uma rigorosa triagem sorológica de doadores. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi analisar o desempenho dos ELISAs recombinante (ELISA-Rec) e convencional (ELISA-Con) no diagnóstico da doença de Chagas, visando o aumento da segurança do receptor do sangue doado, a diminuição das reações cruzadas com outras parasitoses e do número de resultados inconclusivos, que levam ao descarte, muitas vezes

desnecessário, de bolsas de sangue. **Materiais e Métodos:** Utilizamos soros de pacientes de demanda espontânea do Hospital das Clínicas da UFPE bem como soros que fazem parte da soroteca do nosso laboratório. Duzentos e noventa soros - 114 obtidos de indivíduos chagásicos, 143 de indivíduos não-chagásicos e 33 de indivíduos com outras parasitoses, sífilis (n=12), hepatite C (n=7), HIV (n=9) e leishmaniose cutânea (n=5) - foram analisados através dos testes de HAI, ELISA-Con e ELISA-Rec conforme seus fabricantes. **Resultados e Discussão:** Quando utilizamos o teste de HAI e o ELISA-Con, obtivemos 51 resultados inconclusivos (44%), e 2 resultados falso-negativos (1,7%). Em banco de sangue, estes 2 casos teriam suas bolsas de sangue liberadas para a transfusão. Quando utilizamos o ELISA-Con e o ELISA-Rec, o número de resultados inconclusivos foi reduzido para 2. Estes se referem aos 2 casos falso-negativos do ELISA-Con e da HAI, os quais foram reagentes quando testados pelo ELISA-Rec. Se em uma triagem sorológica utilizássemos o ELISA-Con e o ELISA-Rec, esses 2 casos não teriam suas bolsas de sangue liberadas. Os pacientes que apresentaram seus resultados falso-negativos são portadores da forma cardíaca. Os controles foram negativos em todos os ensaios. Reação cruzada foi observada apenas no HAI (sífilis, hepatite C e leishmaniose). **Conclusão.** A utilização do ELISA-Con e ELISA-Rec, concorre para: 1) a diminuição de resultados falso-negativos; 2) a diminuição de resultados inconclusivos e 3) a diminuição de resultados falso-positivos. Além disso, a automação, que concorre para a obtenção de resultados mais seguros e mais rápidos.

Suporte: CPqAM/FIOCRUZ, Biomanguinhos/ FIOCRUZ e CNPq.

ÁREA TEMÁTICA II – EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS.

TL II.1

PESQUISA TRIATOMÍNICA EM ASSENTAMENTO E REASSENTAMENTO DE OCUPAÇÃO RECENTE. REGIÃO ADMINISTRATIVA DE SAÚDE DE PRESIDENTE PRUDENTE, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. Paulo Hiroshi Koyanagui; Susy Mary Perpétuo Sampaio, Marisa Poloni, Maria Esther de Carvalho; Vera Lúcia C. Corrêa Rodrigues & Rubens Antonio da Silva (Superintendência de Controle de Endemias – e-mail: rubens@sucen.sp.gov.br)

Introdução e Objetivos: A Região de Presidente Prudente, situada a sudoeste do estado de São Paulo, apresenta em parte de sua zona rural agrupamentos humanos concentrados em assentamentos e reassentamentos, caracterizados os primeiros, por pessoas de diversas partes do país que buscam lutar por conquistas aos trabalhadores, enquanto que, nos reassentamentos, a população é transferida de uma área a outra, devido, principalmente, à inundação para construção de barragens.O objetivo do presente estudo é analisar a situação triatomínica em área onde famílias foram incorporadas, há pelo menos dois anos, em assentamentos e reassentamentos. **Metodologia:** Para o estudo foram selecionadas duas localidades do Estado de São Paulo, sendo uma caracterizada como de assentamento, no município de Euclides da Cunha Paulista - Assentamento Nova Esperança e outra como reassentamento no município de Paulicéia - Fazenda Buritis. A pesquisa triatomínica seguiu o normatizado pelo Programa de Controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo, desenvolvido pela Superintendência de Controle de Endemias. **Resultados:** Foram pesquisados 117 domicílios sendo, 36 no Assentamento Nova Esperança e 81 na Fazenda Buritis. O número de anexos das duas localidades foi de 572 sendo 72,9% encontrado no reassentamento. Casas habitadas corresponderam a 82,3% e o tipo de construção foi o tijolo rebocado (41,1%) e não rebocado (42,7%). Quanto à pesquisa triatomínica no assentamento, não foram encontrados vestígios ou exemplares de triatomíneos, ao passo que no reassentamento, 136 exemplares de *Triatoma sordida* foram coletados, correspondendo a 24 domicílios positivos. Estes insetos foram capturados no peridomicílio (99,3%) associados a galinheiros e ninhos de roedor. O exame de positividade para *Trypanosoma cruzi* revelou resultado negativo para todos os exemplares. **Conclusões:** Neste estudo, o assentamento não representou problema em termos de infestação triatomínica, atribuído, em parte, pelo tempo de formação do mesmo, onde as construções estão em fase de crescimento. No reassentamento, na transferência da população, foi permitido o transporte dos anexos do peridomicílio das moradias. Este fato pode ter resultado na positividade encontrada, pois alguns insetos podem ter sido transportados passivamente pela população. Outro fator de destaque no reassentamento, esta centrado no grande numero de anexos, principalmente galinheiros, significando oferta alimentar para os triatomíneos. As transformações promovidas pelo homem no ambiente poderão ser revertidas, futuramente, principalmente nos assentamentos, em infestações triatomínicas que venham representar um problema aos mesmos.

TL II.2

PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS (PCDCH): I – CONHECIMENTO E COMPORTAMENTO DE RISCO DE POPULAÇÃO DE ASSENTAMENTO DE OCUPAÇÃO RECENTE NO MUNICÍPIO DE EUCLIDES DA CUNHA PAULISTA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. Marisa Poloni; Susy Mary Perpétuo Sampaio; Maria Esther de Carvalho; Vera Lúcia Cortiço Corrêa Rodrigues & Rubens Antonio da Silva (Superintendência de Controle de Endemias – e-mail: rubens@sucen.sp.gov.br).