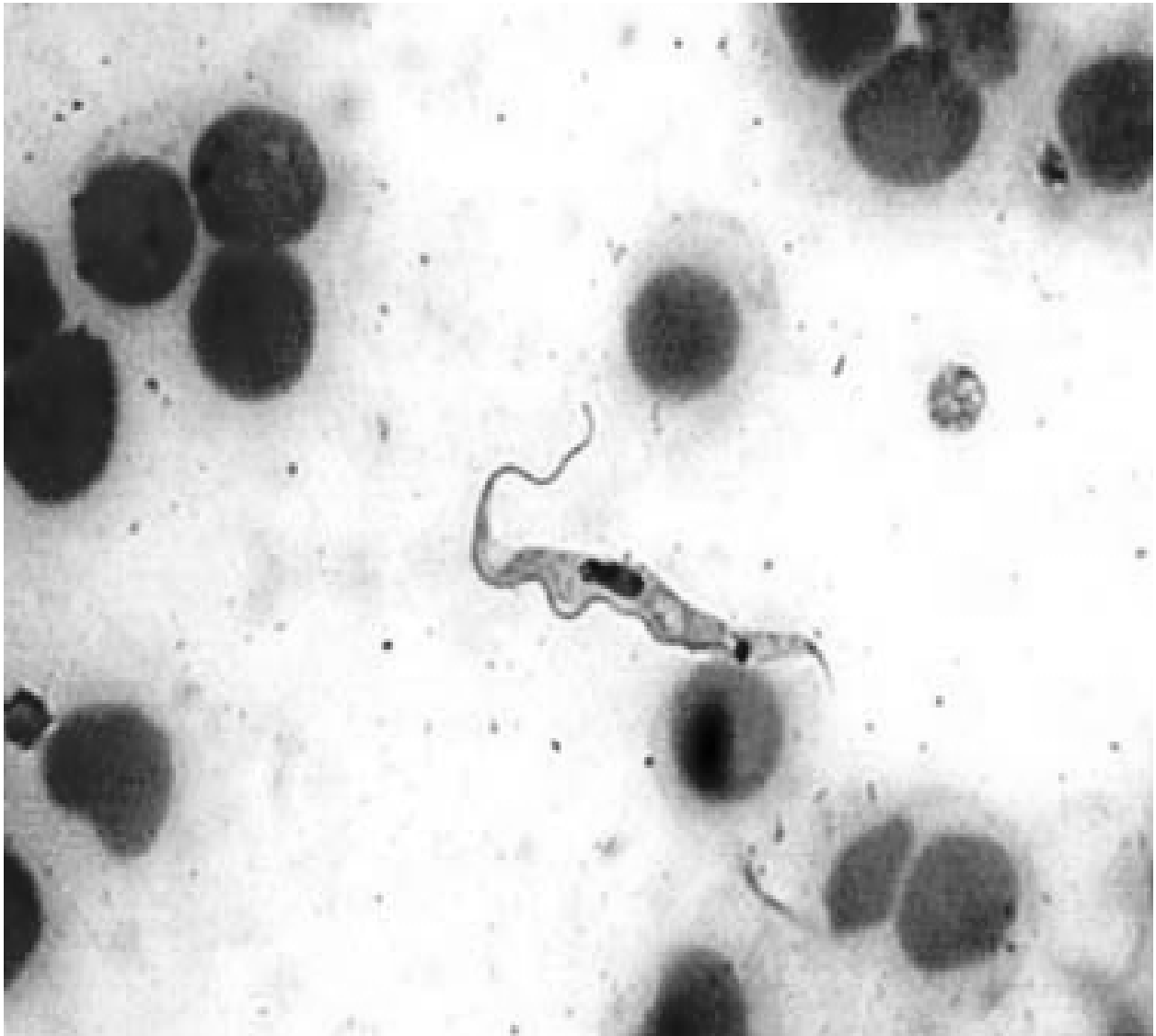


***UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA***



**RECIFE  
2002**

**WANDEJE MARIA BARROS DA ROCHA**

***AVALIAÇÃO DE UM TESTE ELISA RECOMBINANTE  
PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS  
EM BANCOS DE SANGUE***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

**RECIFE  
2002**

*Aos meus pais, Rocha e Celayte,  
e aos meus irmãos, Kíria, Mere e Valber.*

## ***AGRADECIMENTOS***

A Deus, sem o qual nada é possível.

A toda minha família, pela participação de modo integral em todos os momentos deste trabalho.

A Aldo, por ter estado comigo nos vários momentos difíceis que passei ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Andrade, pela enorme paciência, carinho e atenção que me dispensou ao longo desses anos.

Aos doadores de sangue da Fundação Hemope, pela colaboração, mesmo que por vezes involuntária.

Ao Parque Regional de Armamento/7, por sua inestimável colaboração.

A todos os professores, alunos e amigos do Departamento de Genética.

A meus amigos de trabalho, Lucília, José Marcos, Wellington e sua esposa Carla, Juliano, Bergman, Patrícia e Valmir.

A meus amigos do Laboratório de Genética Molecular, em especial, Loiva, Aline, Conceição Maria, Leila, Lígia, Luciano, Iliano e Rafael.

Ao secretário do mestrado, Márcio Pires, pelo apoio e colaboração em todos os momentos.

Ao CNPq e a FACEPE, pela ajuda financeira.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram em meu trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	07
Lista de Tabelas	08
Lista de abreviaturas	09
Resumo	11
Abstract	12
<b>1- Introdução</b>	13
<b>2- Revisão Bibliográfica</b>	15
2.1- Histórico da Doença de Chagas, impacto social e controle	15
2.2- Transmissão	16
2.3- Distribuição e Prevalência	19
2.4- Classificação e Morfologia do parasita	22
2.5- Ciclo Evolutivo	25
2.6- Aspectos Clínicos	26
2.6.1- Forma Aguda	26
2.6.2- Forma Indeterminada	27
2.6.3- Forma Crônica Cardíaca	27
2.6.4- Forma Crônica Digestiva	28
2.6.5- Tratamento	29
2.7- Diagnóstico Laboratorial	29
2.7.1- Métodos Parasitológicos	30
2.7.1.1- Métodos Parasitológicos Diretos	30
2.7.1.1.1- A fresco	30
2.7.1.1.2- Micro-hematócrito	31

	Página
2.7.1.1.3- Técnica de concentração de Strout	31
2.7.1.1.4- Uso de QBC	31
2.7.1.1.5- Técnica de concentração de Ficoll-Hypaque	31
2.7.1.1.6- Lâmina corada	31
2.7.1.1.7- Gota espessa	32
2.7.1.2- Métodos Parasitológicos Indiretos Não Moleculares	32
2.7.1.2.1- Xenodiagnóstico	32
2.7.1.2.2- Hemocultura	33
2.7.1.2.3- Inoculação de animais	33
2.7.1.3- Método Parasitológico Indireto Molecular (PCR)	33
2.7.2- Métodos Sorológicos mais empregados na rotina diagnóstica	34
2.7.2.1- Reação de Fixação de Complemento (RFC)	35
2.7.2.2- Teste de Aglutinação Direta (DAT)	35
2.7.2.3- Hemaglutinação indireta (HAI)	35
2.7.2.4- Imunofluorescência Indireta (IFI)	36
2.7.2.5- Testes Imunoenzimáticos (ELISA)	37
2.7.3- Métodos Sorológicos Empregando Proteínas Recombinantes ou Peptídeos Sintéticos	38
<b>3- Referências Bibliográficas</b>	<b>44</b>
<b>4- Manuscrito</b>	<b>61</b>
<b>5- Apêndice</b>	<b>89</b>
<b>5.1- Instruções para autores</b>	

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Revisão Bibliográfica</b>	
<b>Figura 1.</b> Gráfico demonstrativo dos dados estatísticos da tabela 1.	22
<b>Figura 2.</b> Esquemas mostrando aspectos gerais da ultra-estrutura das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
<b>Manuscrito</b>	
<b>Figura 1.</b> Comparação entre o conjunto diagnóstico da Organon e o ELISA rec, através das distâncias relativas.	83
<b>Figura 2.</b> Comparação entre o conjunto diagnóstico da Gull e o ELISA rec, através das distâncias relativas.	84
<b>Figura 3.</b> Comparação entre o conjunto diagnóstico da Organon e a IFI, através da distância relativa.	85
<b>Figura 4.</b> Comparação entre o conjunto diagnóstico da Gull e a IFI, através da distância relativa.	86
<b>Figura 5.</b> Comparação entre o conjunto diagnóstico ELISA rec e a IFI, através da distância relativa.	87

## ***LISTA DE TABELAS***

	Tabela	Página
<b>Revisão Bibliográfica</b>		
	<b>Tabela 1.</b> Dados estatísticos da Triagem Sorológica da Fundação Hemope, sobre uma população total de 336.845 Doadores.	22
	<b>Tabela 2.</b> Proteínas recombinantes mais conhecidas.	40
<b>Manuscrito</b>		
	<b>Tabela 1.</b> Comparação dos resultados reagentes, indeterminados e não reagentes dos conjuntos diagnósticos comerciais com o ELISA rec.	88



## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Antígeno Recombinante
BHC	Hexaclorociclo-Hexano
CYTED	Projeto Ibero-Americano de Biotecnologia – Programa de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento
CRA	Cytoplasmic Repetitive Antigen
DAT	Direct Agglutination Test
DNA	Desoxiribonucleic Acid
D.O.	Densidade Óptica
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FNS	Fundação Nacional de Saúde
FRA	Flagellar Repetitive Antigen
GP	Glicoproteína
gRNA	Guide Ribonucleic Acid
GST	Glutathione S-Transferase
HAI	Hemaglutinação Indireta
HCV	Hepatitis C Virus
HEMOPE	Hemocentro de Pernambuco
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP	Heat Shock Proteins
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDNA	Kinetoplast Desoxiribonucleic Acid
LB	Luria Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptose
2-ME.	2-Mercaptoetanol
MHC	Major Histocompatibility Complex

---

mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Ministério da Saúde
NAT	Nucleic Acid Technology
nDNA	Nuclear Desoxiribonucleic Acid
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	Orto-Fenileno-Diamina
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCDCh	Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR	Polymerase Chain Reaction
QBC	Quantitative Buffy Coat Method (R)
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RIPA	Radioimunoprecipitação
RNA	Ribonucleic Acid
SAPA	Shed Acute Phase Antigen
SD	Standard Deviation
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TDR	Programa Especial para Pesquisas e Educação em Doenças Tropicais
TIA	Transialidase Inhibition Assay
TMB	Tetra-Metil Benzidina
WHO	World Health Organization

## RESUMO

O emprego de dois testes sorodiagnósticos para a doença de Chagas é obrigatório para toda triagem sorológica de doadores em Bancos de Sangue, mas os disponíveis atualmente só utilizam extratos totais, frações semipurificadas ou purificadas das formas epimastigotas e possuem uma considerável variação na reprodutibilidade e na confiabilidade, principalmente devido às reações cruzadas ou à padronização dos reagentes. Desta forma, recomenda-se o uso de antígenos recombinantes, que podem contribuir para aumentar a sensibilidade e a especificidade do ensaio, além de reduzir custos. Comparamos os resultados obtidos com as três metodologias usadas na Fundação Hemope: a HAI e o ELISA, empregados na triagem, e a IFI, empregada como teste confirmatório com o ELISA recombinante *in-house* preparado com o antígeno DH-1D. A comparação foi realizada com 298 soros (positivos, indeterminados ou negativos) obtidos dos doadores após a realização do teste confirmatório. O rec ELISA quando comparado com o conjunto diagnóstico da Organon, apresentou uma sensibilidade ligeiramente maior de 97% enquanto no outro a sensibilidade foi de 95%. Quando comparado com o conjunto diagnóstico da Gull, apresentou uma sensibilidade bem menor de 88% enquanto no outro a sensibilidade foi de 95%. Como nesse estudo, o ELISA rec não apresentou resultados muito superiores aos conjuntos diagnósticos comerciais, que possuem resultados muito discordantes entre si, continuaremos aprimorando o nosso antígeno recombinante isoladamente ou utilizando juntamente com outros que já possuímos. Os dados da HAI não foram utilizados porque apresentaram resultados muito discordantes. E com relação a IFI, podemos dizer que apesar da sensibilidade e da especificidade serem consideradas elevadas, na prática, esse teste não é adequado para ser usado como confirmatório e conseqüentemente não pode ser considerado o teste gold standard.

## ABSTRACT

The use of two tests in blood bank screening for the Chagas disease is required for blood bank-based donor screening, but the tests currently available use solely full extracts or semi purified fractions of epimastigotes with a sizeable deviation in the reproducibility and reliability, mainly due to the cross-matching or the reagent standardization. Hence, the use of recombinant antigens that can promote the accuracy and specificity enhancement of the test is recommended, while reducing costs. We compared the results achieved with these three methods used in Pernambuco's Hemope Foundation (Pernambuco State, Brazil): the IHA and the ELISA, used for the screening, and the IIF, used for positive test with *in-house* recombinant ELISA prepared with the DH-1D antigen. The evaluation has been performed with 298 serum specimens (positive, undefined or negative) from blood donors after the positive test. When compared with the Organon kit, rec ELISA featured sensitivity slightly higher than 97% while in the other the sensitivity recorded was of 95%. But when compared with the Gull kit, it showed quite below 88%, while in the other the sensibility was 95%. As, further to that report, the rec ELISA didn't feature results far above to what the commercials kits did, featuring quite divergent results among them, we will keep improving our recombinant antigen, either separately or used along with others we currently have. HAI's data weren't used as they featured quite divergent results. Finally, as for the IIF, one can say that, despite its high sensitivity and specificity be regarded as high, it isn't suited to be used with positive tests and therefore cannot be considered as the gold standard test.

## 1- Introdução

A doença de Chagas constitui um grave problema de saúde pública nas Américas e é considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das cinco endemias mais importantes do mundo. Sua distribuição vai do México à Argentina, com cerca de 16 a 18 milhões de indivíduos infectados. O agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao homem por insetos hematófagos da sub-família Triatominae, conhecidos como barbeiros. Com o sucesso do controle da transmissão vetorial no Brasil e em vários outros países da América Latina, a transmissão transfusional, segunda mais importante forma de transmissão, vem ganhando crescente importância. O controle do doador é, naturalmente, a chave para a interrupção desta via de transmissão. Na ausência de sinais clínicos da doença o diagnóstico laboratorial torna-se a única forma de identificar o indivíduo portador da infecção.

Ao indicar técnicas de diagnóstico laboratorial para a doença de Chagas, deve-se levar em consideração, além de suas características de sensibilidade e especificidade, sua adequação a diferentes fases da doença. Na fase aguda, a parasitemia é elevada, mas transitória, limitando a utilidade dos métodos parasitológicos diretos a esta fase. Já na fase crônica, a parasitemia é muito baixa; assim, as técnicas sorológicas ganham grande importância na solução do problema.

Em relação aos métodos parasitológicos podemos dizer que, na fase aguda, deve ser priorizada a procura do parasita por exame direto, seja a fresco ou por métodos de concentração. E durante a fase crônica, o tipo de exame empregado difere dos utilizados na fase aguda, porque se baseia na multiplicação do parasita, sendo indicado apenas para confirmação diagnóstica em casos de sorologia duvidosa, aferição da parasitemia visando avaliar a eficácia de tratamentos tripanocidas, controle de cura ou isolamento do parasita. O método parasitológico indireto molecular é a PCR, cujos maiores progressos tiveram lugar após a amplificação de fragmentos de minicírculos do DNA do cinetoplasto; possui elevada sensibilidade e especificidade e pode ser empregado na fase crônica da doença, assim como na fase aguda. Entretanto, o custo da técnica e os problemas advindos com a contaminação de material de laboratório com os produtos de

amplificação de reações anteriores têm dificultado a adoção da técnica como rotina de laboratório.

Os métodos sorológicos são mais econômicos, rápidos e eficazes, sendo, portanto os de escolha para a realização de testes em grande escala, embora apresentem algumas limitações inerentes à sua própria natureza, como por exemplo, a existência de reações cruzadas e resultados falso-negativos. Como em toda área tecnológica, as reações sorológicas têm sido estudadas e aperfeiçoadas, de modo a permitir cada vez mais uma maior margem de segurança em seus resultados. Os testes mais utilizados são a hemaglutinação indireta, a imunofluorescência indireta, e os testes imunoenzimáticos.

Os antígenos utilizados comercialmente são os não-purificados, os purificados ou ainda parasitas inteiros (no caso a imunofluorescência indireta). Ainda restritos às experiências descritas em laboratório há antígenos recombinantes, peptídeos sintéticos e antígenos secretados/excretados. Por sua facilidade de produção, os antígenos recombinantes são os naturais candidatos ao desenvolvimento de novos ensaios sorodiagnósticos, destacando-se para tal fim os antígenos H49, CRA/FRA, JL8, B13 e SAPA. Nenhum deles, contudo, tem sido adotado na rotina laboratorial, porque ou ainda não foram padronizados ou não estão sendo comercializados.

A triagem sorológica para doença de Chagas nos bancos de sangue do Brasil, deve ser realizada obrigatoriamente com no mínimo dois métodos com princípios diferentes (Portaria nº 721 do Ministério da Saúde, 1989). Os testes disponíveis hoje em dia, mesmo usando dois de metodologia diferentes; com frequência relativamente alta dão resultados discordantes entre si e, conseqüentemente, fazem com que algumas bolsas de sangue sejam descartadas desnecessariamente na etapa inicial da triagem sorológica o que gera uma quantidade enorme de doadores com resultados indeterminados, até que outros testes confirmatórios sejam realizados. É fundamental o investimento na pesquisa de novos testes que aliem a indispensável elevada sensibilidade a uma especificidade satisfatória.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal padronizar e avaliar um teste ELISA utilizando uma proteína recombinante denominada DH-1D, isolada em Pernambuco, na triagem sorológica de rotina em bancos de sangue.

## 2- Revisão Bibliográfica

### 2.1- Histórico da Doença de Chagas, impacto social:

Em 1909, o Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas publicou o seu primeiro trabalho demonstrando a descoberta de “uma nova entidade mórbida do homem produzida por um *Trypanosoma*” (Chagas, 1909).

Em viagem ao interior de Minas Gerais, motivada por uma campanha antimalárica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brasil. Carlos Chagas foi avisado de que na região pobre da localidade de Lassance, havia hemípteros que sugavam o sangue das pessoas durante o sono. Em um trabalho único e excepcional na história da medicina, ele pode descrever a doença, demonstrar a presença de parasitas no conteúdo intestinal dos hematófagos e, depois, na circulação dos pacientes e de outros mamíferos. Desta forma ele pode descrever o agente causador, o transmissor e o modo de transmissão da doença, como também comprovar a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença (Silva *et al.*, 2001; Carlier *et al.*, 2002).

Este parasita foi inicialmente denominado *Schizotrypanum cruzi*. Depois, o nome *Schizotrypanum* foi mantido como sub-gênero, sendo a designação completa *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Em reconhecimento ao trabalho memorável de Carlos Chagas, Dr. Oswaldo Cruz conferiu à nova enfermidade o nome de “doença de Chagas”.

A doença de Chagas é um exemplo típico de enfermidade resultante das distorções econômicas e das injunções sociais. O *T. cruzi* vivia restrito à situação silvestre, circulando entre mamíferos do ambiente silvestre, através do inseto vetor ou também, muito comumente, por via oral. Foi o homem quem invadiu esses ecótopos e se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao hemíptero vetor abrigo adequado em vivendas rurais de péssima qualidade, frutos das perversas relações de produção e de políticas sociais restritivas, comuns na América Latina (Dias, 1979; Dias, 1997).

O êxodo rural e as campanhas de controle reduziram em muito a transmissão vetorial (United Nations, 1992; OPAS, 1995; Moncayo, 1999; Silveira & Vinhaes, 1999, WHO, 2002), mas houve um concomitante aumento da probabilidade de contaminação por *T. cruzi* em doadores de sangue (Coura *et al.*, 1966; Rohwedder, 1969; Cerisola *et al.*, 1972; Dias, 1979; Zuna *et al.*, 1985; Schmunis, 1985). Atualmente, na maioria dos países da América Latina, mais de 60 % da população aglomera-se nas cidades (United Nations, 1992; OPAS, 1995; Moncayo, 1999; Silveira & Vinhaes, 1999; WHO, 2002).

## **2.2- Transmissão:**

O vetor da doença de Chagas é um inseto hemíptero, reduvídeo da subfamília *Triatominae*, popularmente conhecido como (barbeiro, chupão, fincão, bicudo, chupança ou procotó) e é muito conhecido das populações rurais de várias regiões do Brasil. De tamanho relativamente grande, os insetos adultos podem medir de 1 a 4 cm de comprimento, geralmente pretos ou acinzentados, possuindo manchas vermelhas, amarelas ou alaranjadas ao redor de seu abdome (Barreto *et al.*, 1979; Dias, 1989).

Existem 118 espécies conhecidas de barbeiros, das quais 42 já foram identificadas no país, e 30 capturadas no ambiente domiciliar. Dessas, cinco têm especial importância na transmissão da doença ao homem. Por ordem de importância: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. (Guia de Vigilância Epidemiológica).

Tanto os barbeiros machos como fêmeas são hematófagos e podem alimentar-se de qualquer tipo de sangue, seja de uma ave, de um mamífero, inclusive o homem ou mesmo de animais de sangue frio. Geralmente se abrigam em locais muito próximos à fonte de alimento, ou seja, podemos encontrá-los vivendo em ninhos, em casas, em buracos de tatus, em galinheiros, etc. Costumam sair a noite para procurar alimento, quando os indivíduos e animais encontram-se dormindo, porque é importante que os mesmos estejam quietos durante o repasto de sangue, que demora de 10 a 20 minutos (Dias, 1989).



A transmissão do *T. cruzi* pela transfusão de sangue foi um dos poucos assuntos não suspeitados por Carlos Chagas, mas descoberto no fim da década de 40, depois das publicações de Salvador Mazza, Emmanuel Dias e outros pioneiros (Dias & Schofield, 1999). A transfusão de sangue total, de plasma ou de concentrado de hemácias contaminados constitui-se na segunda via de transmissão em importância. O risco de transmissão varia com a prevalência da doença na região em que a transfusão é feita, podendo chegar a níveis bem elevados. Oferece um risco estimado entre 12,5 a 25,0 % para uma única transfusão padrão de 500ml de sangue total. (Silva *et al.*, 2001).

Com a intensa migração de populações de áreas rurais, em que a doença era mais freqüente, para as urbanas, cresceu o risco dessa modalidade de transmissão, pois o controle sorológico dos doadores não era adequadamente realizado. (Silva *et al.*, 2001). Enquanto não se puder fazer uma triagem sorológica para doença de Chagas com absoluta segurança no sangue dos doadores, existirá a possibilidade de transmissão da infecção por meio da transfusão (Rohwedder, 1969; Schmunis, 1985). Infelizmente há 10 anos ainda eram poucos os países latino-americanos que realizavam sorologia para *T. cruzi* em 100% dos doadores (Zuna *et al.*, 1985; WHO, 1991). Nos países sem este controle, o risco de receber sangue contaminado guardava uma relação direta com a prevalência da infecção na população de doadores e com o número de transfusões recebidas (Rohwedder, 1969; Cerisola *et al.*, 1972). Os mais expostos são os indivíduos politransfundidos, como os hemofílicos ou outros pacientes com transtornos hematológicos ou pacientes que recebem diálise (Cerisola *et al.*, 1972). A partir de 1995 todos os países do Cone Sul adotaram a triagem de doadores. Desta forma 325.000 novos casos por ano foram evitados, com uma redução estimada de 127.000 casos de cardiopatia e morte súbita. Os países do Cone Sul economizaram, assim, US\$ 1,2 bilhões de em despesas médicas e de seguro social (TDR, 2001).

No Brasil, Portarias do Ministério da Saúde regulamentam a triagem sorológica de candidatos à doação de sangue, sendo exigida a execução, com o material de cada doador, de pelo menos dois testes sorológicos, baseados em diferentes princípios. A obediência a essas condições contribui para o necessário controle da transmissão transfusional (Silva *et al.*, 2001).

De fato, somente se pode especular sobre a porcentagem de indivíduos que se contaminam depois de receber sangue total ou hemoderivados infectados. Ao contrário, parece segura a utilização dos produtos liofilizados (Cerisola *et al.*, 1972; Schmunis, 1991; Wendel & Pinto Dias, 1992). A incidência potencial naqueles que recebem unidades contaminadas estaria entre 12 e 25% na Argentina, Brasil e Chile, mas chegaria a quase 50% na Bolívia, embora esses números de risco careçam de confirmação (Rohwedder, 1969; Cerisola *et al.*, 1972; Zuna *et al.*, 1985; WHO, 1991, Schmunis, 1991; Wendel & Pinto Dias, 1992). Foi estimado que o número de doadores no Brasil com sorologia positiva para *T. cruzi* é 55.000, dos quais se sabe que 11.000 não foram submetidos à triagem sorológica em banco de sangue. Foi estimado também que entre 1.500 e 3.000 pessoas ao ano adquiririam infecção por meio da transfusão (Amato Neto, 1993). Infelizmente, essas cifras poderiam ser maiores já que o verdadeiro número anual de doadores no país está em discussão, variando entre 3,6 e 5 milhões (Wendel & Pinto Dias, 1992; Dias, 1992; OPAS, 1997). Em 2000, informou-se que a prevalência de sorologia positiva foi de 0,6% nos 1.827.937 doadores atendidos pela rede pública de hemocentros, porém faltava informação sobre a situação do resto dos doadores da rede privada (ANVISA, 2000).

A transmissão congênita, embora numericamente pequena, é o terceiro mecanismo mais importante (Dias, 1988; WHO, 1991; Storino, 1994). Pode ocorrer desde o terceiro mês de gestação, incidindo especialmente do terceiro ao quinto mês, sempre dependendo da lesão placentária (Moya & Moretti, 1997). Em países como o Brasil onde os casos congênitos estão se tornando raros, a estratégia usual é usar a sorologia convencional quando os bebês alcançam os seis meses (quando os anticorpos maternos terão desaparecido) e tratar imediatamente aqueles com resultado positivo (Dias, 1987; WHO, 1991).

A transmissão acidental é lamentavelmente freqüente em laboratórios, e cerca de 50 casos foram bem registrados, geralmente como um resultado de punção acidental de agulhas infectadas ou salpicos com fezes de triatomíneos contaminados ou com material de cultura (Brener, 1987).

A transmissão pode ocorrer pelo transplante de virtualmente qualquer órgão do doador infectado ao receptor suscetível. A sorologia pré-cirurgia tanto do

doador quanto do receptor deve ser obrigatória em áreas endêmicas, ou quando um ou outro tem uma história epidemiológica de possível contato com o parasita. Contudo, em casos urgentes o transplante deve se proceder e a melhor estratégia é o tratamento específico do doador infectado, quando possível, durante 10 dias antes da cirurgia, e tratamento similar do receptor um dia antes da cirurgia e posteriormente por 9 dias. A razão é para minimizar os parasitas circulantes no doador a fim de inibir o estabelecimento deles no receptor (Dias *et al.*, 1986).

A transmissão oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasita, sendo usual entre mamíferos do ciclo silvestre da tripanossomíase, que ingerem triatomíneos ou outros mamíferos infectados (Zeledón, 1974; Barreto *et al.*, 1979). Para o homem, há relatos esparsos de sua ocorrência, através da ingestão de alimentos contaminados por *T. cruzi*, como por exemplo, carnes de caça cruas ou mal cozidas, contaminadas e mesmo outros alimentos, durante cujo preparo possa ter ocorrido à contaminação com material dos próprios vetores infectados (Dias, 1979; Storino, 1994; Dias, 1997; Valente *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). Também é possível a contaminação de lactentes através da sucção de leite materno infectado, em nutrízes chagásicas, fato absolutamente esporádico e raro, com apenas um ou dois casos prováveis registrados (Fernandes *et al.*, 1994; Storino, 1994; Dias, 1997).

### **2.3- Distribuição e Prevalência:**

A doença de Chagas é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano. É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos até a latitude 45°S, no sul da Argentina e Chile. É endêmica em 21 países e estima-se que sejam de 16 a 18 milhões os indivíduos infectados. Até o fim do século passado cerca de 200.000 novos casos eram registrados a cada ano, e havia cerca de 100 milhões de indivíduos em risco de contaminação na América Latina. O Brasil, com 1,3% da prevalência global tem cinco milhões de pessoas com doença de Chagas, mas a transmissão vetorial foi considerada como interrompida em todos os estados onde a doença era endêmica (Carlier *et al.*, 2002; WHO, 2002).

De fato, indicadores entomológicos de uso rotineiro apontam para a virtual eliminação da principal espécie vetora no país, *Triatoma infestans*, dos domicílios. No fim do século restavam apenas alguns focos de importância no nordeste do Estado de Goiás e sul de Tocantins, na região do Além São Francisco, na Bahia, no norte do Estado do Rio Grande do Sul e no sudeste do Piauí (Vinhaes & Dias, 2000). No caso das outras espécies, sobretudo *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, ainda que as respostas sejam mais lentas, tem sido possível manter níveis de infestação e de colonização intradomiciliar incompatíveis com a transmissão, apesar de que, nesse caso, seja necessário um trabalho de vigilância de caráter contínuo, com pronta intervenção, uma vez haja evidência de constituição de colônias na habitação (Silveira & Vinhaes, 1998).

No documento original da Iniciativa do Cone Sul, em Brasília, julho de 1991, integrando os objetivos principais da iniciativa dos seis países para a eliminação da doença de Chagas, foram intensificadas as ações de controle das atividades hemoterápicas, em paralelo com o controle intensivo ao *Triatoma infestans*, principal vetor da doença nas Américas. Através das atividades específicas e também como produto direto do controle vetorial, nota-se importante diminuição dos riscos de transmissão transfusional do *T. cruzi* nas áreas trabalhadas. Além de legislação específica sobre a qualidade da hemoterapia, implementaram-se laboratórios nacionais e regionais de referência, com a assistência da OPAS, objetivando uma boa sorologia pré-transfusional dos doadores, cuja cobertura tem aumentado. Observa-se ainda uma progressiva diminuição na prevalência da infecção chagásica entre doadores e também um progressivo deslocamento dos doadores infectados para grupos etários mais elevados, como fruto do controle vetorial e do próprio descarte de doadores soropositivos em doações anteriores (Iniciativa Del Cono Sur, 1991).

No contexto epidemiológico da doença de Chagas humana no Brasil, a região Nordeste ocupa importância acentuada, tendo sido a segunda em número de infectados e de índices de infestação triatomínica nos inquéritos nacionais de prevalência e distribuição dos vetores realizados entre 1975 e 1980 (Castro Filho & Silveira, 1984; Fiusa-Lima & Silveira, 1984; Silveira *et al.*, 1984). Passados vinte anos dessas históricas observações, a região ainda preocupava em termos do risco de transmissão, já que em 1996, o PCDCh da FNS/MS acusou o Nordeste como a

região com maior número de capturas (69,2% do País) (Dias, 1998). Quanto à endemia chagásica, no inquérito nacional de 1978-1980, o Nordeste apresentou uma prevalência geral de 3,05% da infecção chagásica (Brasil = 4,40%) (Fiusa-Lima & Silveira, 1984).

Muitos destaques históricos pertinentes à doença de Chagas no Nordeste, especialmente a partir dos anos 50, advêm de pesquisas sucessivas e importantes de eminentes cientistas. Assinalaram-se ainda, três fatos muito relevantes da história contemporânea da doença e de seu controle, marcados pelo Nordeste do Brasil: a) o programa atual de controle da doença no Brasil foi inaugurado pelo Ministro Waldir Arcoverde, no Piauí, em 1982; b) o modelo de controle da doença transfusional e de outras moléstias veiculadas por hemoterapia, foi gestado e implantado de modo pioneiro em Pernambuco, pelo HEMOPE (Dr. Luís Gonzaga dos Santos) na década de 60; c) dentre os primeiros serviços regulares de atenção médica ao chagásico, sobressaiu-se o modelar ambulatório do Hospital Oswaldo Cruz, em Recife (Dr. Wilson Oliveira Jr. e colaboradores), em 1987 (Dias *et al.*, 2000).

Hoje, a prevalência da infecção chagásica entre doadores de sangue atinge valores próximos de zero em São Paulo. Entretanto varia entre 2,0 a 4,0%, na América Latina em geral. Ocasionalmente esses dados podem elevar-se, dependendo da região em foco, como é o caso de algumas áreas bolivianas, em que essa prevalência chega a níveis acima de 60,0%. No Brasil o valor médio é de 0,7%, sendo o limite superior verificado no Estado de Goiás, próximo a 5,0%.

Os nossos dados, na Fundação HEMOPE, com relação à população de Recife e da região Metropolitana na fase inicial de triagem sorológica, revelam que a média percentual de 01/1998 a 12/2001 de soros reagentes está na faixa de 0,1% e de indeterminados 0,4%, num total de 336.845 doadores (tabela 1); podemos observar que houve uma diminuição gradativa do percentual, ao longo dos anos, tanto dos reagentes quanto dos indeterminados (Fundação Hemope, 2002).

Tabela 1. Dados estatísticos da Triagem Sorológica da Fundação Hemope, sobre uma população total de 336.845 doadores.

Triagem	1998	1999	2000	2001	Média
Reagente	0,20%	0,10%	0,00%	0,00%	0,10%
Indeterminado	0,70%	0,50%	0,30%	0,20%	0,40%
Total	0,90%	0,60%	0,30%	0,20%	0,50%
Total de doadores	77.480	80.330	87.068	91.967	84.211

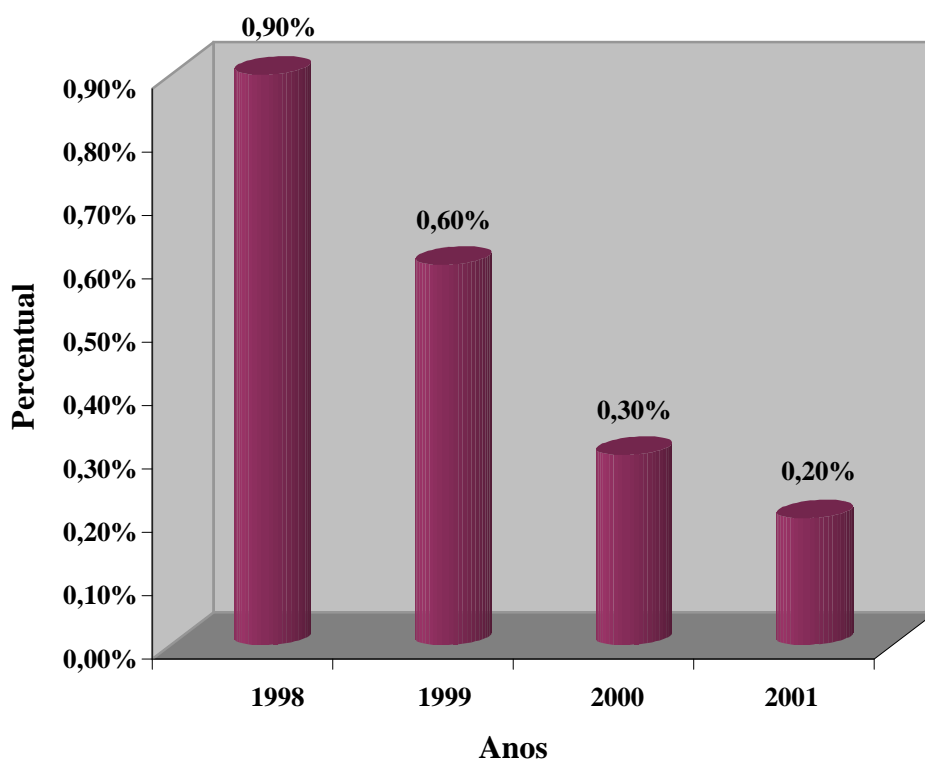


Figura 1. Gráfico demonstrativo dos dados estatísticos da tabela 1.

#### **2.4- Classificação e Morfologia do parasita:**

Na ordem Kinetoplastida encontramos flagelados com um a quatro flagelos, que se originam de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar, e normalmente contendo uma estrutura paraflagelar e uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de

uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário. São também estruturas características, as organelas especiais do tipo peroxissoma, conhecidas como glicossomas, e microtúbulos subpeculiares. A família Trypanosomatidae é composta exclusivamente por parasitas, tendo um flagelo e um cinetoplasto. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes, dentro da família Trypanosomatidae, por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes, como o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas e os *T. rodhesiense* e *T. gambiense*, agentes da doença do sono (De Souza, 2000).

Com base no comportamento do parasita nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos: **Stercoraria** e **Salivaria**. O **Stercoraria** inclui tripanossomas como o *T. cruzi*, que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectivas pelas fezes (De Souza, 2000). Os agentes da doença do sono estão no grupo **Salivaria**. A grande complexidade no comportamento biológico dos tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* levou à criação de alguns subgêneros. Neste caso é importante mencionar o subgênero *Schizotrypanum*, no qual está incluído o *T. cruzi* (Corliss, 1994).

Podemos definir as formas evolutivas para os tripanossomatídeos, com base na forma geral da célula (esférica, piriforme, alongada), na posição relativa entre o núcleo e o citoplasma (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral) (Vickerman & Preston, 1976). No caso do *T. cruzi* encontramos as formas epimastigota, tripomastigota, amastigota (figura 1) e uma forma chamada de esferomastigota (no estômago do inseto vetor e em determinadas situações experimentais *in vitro*). Obviamente, uma série de formas intermediárias pode ser observada. Por exemplo, a forma tripomastigota pode se apresentar como fina e longa (núcleo alongado, cinetoplasto subterminal e flagelo livre longo) ou espessa e curta (núcleo oval e cinetoplasto terminal). (De Souza, 2000).

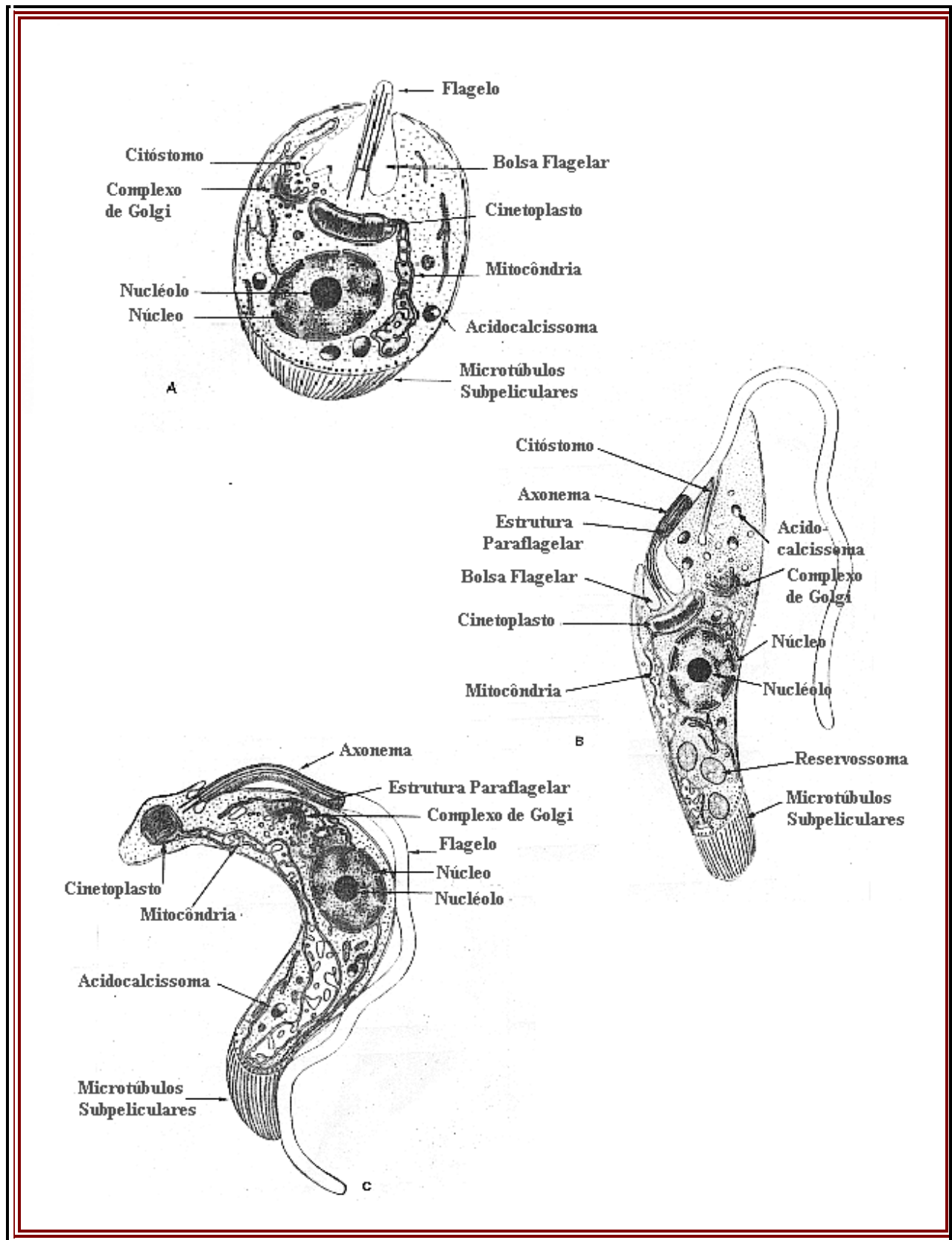


Figura 2. Esquemas mostrando aspectos gerais da ultra-estrutura das formas amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C) do *Trypanosoma cruzi* (De Souza, 2000).



## **2.5- Ciclo Evolutivo:**

Na transmissão vetorial, os insetos ao se alimentarem do sangue parasitado, ingerem as formas tripomastigotas do parasita. Uma pequena parte dos tripomastigotas diferencia-se em epimastigotas, sendo estas formas capazes de se multiplicar no invertebrado. Os epimastigotas fixam-se no intestino médio do triatomíneo e permanecem neste local, mantendo o inseto infectado, provavelmente por toda a vida. Os parasitas que se dirigem para o reto sofrem influências de componentes das fezes e da urina do inseto e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (Brenner, 1973). Como os triatomíneos possuem o hábito de defecar após o repasto, suas fezes, acompanhadas de urina, carregam as formas infectantes do parasita para a pele ou mucosa do hospedeiro. As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de penetrar na pele, utilizando o ferimento deixado pela picada do inseto ou através de lesões ocasionadas pelo ato de coçar a região picada. Após penetrar na derme, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do sistema fagocítico mononuclear regional, onde escapam do vacúolo fagocitário e no citoplasma transformam-se em amastigotas. (De Souza, 2000).

As formas amastigotas têm a capacidade de se dividir, e multiplicar-se no citoplasma da célula hospedeira; por fim diferencia-se de novo em tripomastigotas, lisando a membrana do macrófago e sendo liberadas no interstício. Os tripomastigotas assim formados, chamados de tripomastigotas sanguíneos, ganham a circulação e espalham-se por todo o organismo, podendo potencialmente penetrar em qualquer tipo celular encontrado no local e aí se desenvolver, exceto em neutrófilos e eosinófilos. Por sua vez, as formas epimastigotas são fagocitadas por células com capacidade fagocítica existentes no local e rapidamente digeridas. O ciclo é fechado quando o triatomíneo não infectado faz o repasto e ingere, junto com o sangue, formas tripomastigotas sanguíneas capazes de infectar o vetor (De Souza, 2000).

## **2.6- Aspectos Clínicos:**

### **2.6.1- Forma Aguda:**

A fase aguda da doença compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros meses de infecção (dois a quatro) e, do ponto de vista laboratorial delimita-se, mais ou menos imprecisamente, pela demonstração do parasita no sangue por meio de exame direto (Laranja, 1953).

A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular (sinal de Romaña) ou cutânea (chagoma de inoculação). O sinal de Romaña consiste, essencialmente, em edema bipalpebral unilateral, elástico e indolor, de início geralmente brusco, coloração róseo-violácea das pálpebras, congestão conjuntival e enfartamento de linfonodos satélites; com muita frequência, o edema se propaga a hemiface correspondente (Romaña, 1935 apud Rassi, *et al.*, 2000). Já o chagoma de inoculação, apresenta-se como uma formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, com alguns centímetros de diâmetro, eritematosa, dura, indolor ou algo dolorosa, quente e circundada por edema elástico, assemelhando-se a um furúnculo que não chega à supuração; acompanha-se de enfartamento de linfonodos satélites e, às vezes, exulcera-se ou se ulcera; localiza-se em qualquer parte do corpo, principalmente nas partes descobertas durante o sono (Mazza & Freire, 1940 apud Rassi, *et al.*, 2000).

O período de incubação, de acordo com observações feitas no homem e em animais de laboratório (Chagas, 1936; Talice, 1944 apud Rassi, *et al.*, 2000; Romaña, 1963 apud Rassi, *et al.*, 2000), varia entre quatro e 10 dias, tempo necessário para o desenvolvimento de uma ou duas gerações de parasitas, respectivamente. Com frequência, principalmente em adultos, o quadro clínico é oligossintomático, não sendo valorizado pelo paciente, que deixa de procurar recursos médicos e, se os procura, a hipótese diagnóstica não é lembrada (Rassi *et al.*, 2000).

Clinicamente, a infecção chagásica se inicia (excluindo-se os sinais de porta de entrada, já discutidos) com um conjunto de manifestações, variáveis em frequência e intensidade. Como sintoma geral e de aparecimento precoce, destaca-

se a febre, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia. Dentre as alterações sistêmicas, destacam-se: o edema subcutâneo, o aumento de volume dos linfonodos, a hepatomegalia e a esplenomegalia, podendo ser observadas, ainda, manifestações de comprometimento cardíaco e de meningoencefalite (Rassi *et al.*, 2000).

### **2.6.2- Forma Indeterminada:**

Em 1916, Carlos Chagas reconheceu a existência de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* que não apresentam quadro clínico da doença. Para designar a infecção na “ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes” da doença, ele utilizou o termo “forma crônica indeterminada”. (Chagas, 1916). Desde então, diversos autores utilizaram termos diferentes para se referir a essa forma da doença, incluindo indeterminada, latente, subclínica e laboratorial. Atualmente, entende-se por forma indeterminada da doença a presença comprovada da infecção chagásica (positividade sorológica e/ou parasitológica) na ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo (Reunião de Pesquisa, 1985).

De um modo geral, os pacientes nessa forma clínica da doença, muitas vezes desconhecem a presença da infecção chagásica porque, em geral, apresentam bom estado de saúde e excelente capacidade laborativa. Sendo assim, a importância da forma indeterminada da doença é primordialmente epidemiológica (Laranja *et al.*, 1956): estima-se que cerca de 50% dos infectados chagásicos apresentem essa forma da doença (Macedo, 1980). Embora reconhecendo que o prognóstico desses pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses indivíduos podem evoluir, a cada ano, para formas determinadas da doença (Dias, 1989).

### **2.6.3- Forma Crônica Cardíaca:**

A forma clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi*, resulta na cardiopatia chagásica crônica, decorrente de dano miocárdico progressivo causado pela incessante miocardite fibrosante. Aproximadamente 30% dos indivíduos soropositivos desenvolvem alguma forma de expressão de doença crônica cardíaca; em cerca de 30% desses, as manifestações clínicas serão significativas, associando-

se a conspícua morbidade e mortalidade (Laranja *et al.*, 1956; Dias, 1985; Dias, 1989; Hagar & Rahimtoola, 1995).

O que caracteriza a expressão clínica da doença cardíaca é a presença de sintomas, sinais físicos e alterações em exames laboratoriais simples, no ECG e na radiografia torácica (Dias, 1985; Dias, 1989).

Nas fases iniciais da cardiopatia, os sintomas mais frequentes são palpitações, fadiga aos esforços e dispnéia. Contudo, é incomum o registro de sintomas mais característicos de congestão pulmonar, como ortopnéia e dispnéia paroxística noturna (Marin-Neto *et al.*, 2000). Já a forma mais comum de expressão dos distúrbios de ritmo na moléstia de Chagas constitui-se em mal-estar incharacterístico, de início súbito, podendo surgir durante repouso ou ser desencadeado por esforço físico intenso, é habitualmente fugaz e com término espontâneo. É costumeiramente designado, em regiões endêmicas, como “avexame”, “baticum” ou “batedeira” (Marin-Neto *et al.*, 2000).

#### **2.6.4- Forma Crônica Digestiva:**

As alterações que ocorrem no trato digestivo como resultado da infecção pelo *T. cruzi* são devidas à destruição das células nervosas, os plexos mioentéricos. Os plexos intramurais, por estarem localizados nas paredes das vísceras, são as estruturas mais atingidas, em virtude do parasitismo das camadas musculares vizinhas (Smith & Morson, 1972).

A denominação de forma digestiva foi proposta por Rezende, em 1956, e validada pela comunidade científica, com o propósito de nela incluir, além do megaesôfago e megacólon, todas as alterações anatômicas e funcionais conhecidas ou que viessem a ser descritas no sistema digestivo, secundárias à doença de Chagas (Rezende, 1956).

Conforme a região geográfica ou o país considerado, as manifestações digestivas têm sido relatadas com uma frequência variável. A prevalência da forma digestiva situa-se abaixo de 10%, muito inferior, portanto, à prevalência da forma cardíaca. Os estudos existentes apontam para uma incidência aparentemente bem maior de megaesôfago e megacólon na região central do Brasil, compreendendo

parte dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia. (Rezende & Moreira, 2000).

### **2.6.5- Tratamento:**

Com o objetivo de suprimir a parasitemia e, conseqüentemente, seus efeitos patogênicos ao organismo, tem-se feito tratamento específico, com Benzonidazol (Radanil, Rochagan ou Ragonil - Roche) ou Nifurtimox (Lampit – Bayer). Esse tratamento está indicado na fase aguda da doença, em casos congênitos, na reativação da parasitemia por imunossupressão (AIDS e outras doenças imunossupressoras), e para transplantados que receberam órgão de doador infectado, quando a supressão da parasitemia ou a prevenção do seu aparecimento tem ação benéfica para os pacientes. Existem recomendações específicas para o tratamento da doença de Chagas crônica. Está contra-indicado para gestantes, porque além de não impedir a infecção congênita, as drogas podem causar danos ao concepto (Guia de Vigilância Epidemiológica; Dias & Schofield, 1999).

No tratamento sintomático das formas cardíacas, as drogas utilizadas são as mesmas que se usam em outras cardiopatias. Em alguns casos, indica-se a implantação de marcapasso, com resultados bastante satisfatórios, na prevenção da morte súbita. No tratamento das formas digestivas, dependendo do estágio em que a doença é diagnosticada, indicam-se medidas mais conservadoras (uso de dietas, laxativos ou lavagens). Em estágios mais avançados, impõe-se a dilatação ou correção cirúrgica do órgão afetado (Guia de Vigilância Epidemiológica).

### **2.7- Diagnóstico Laboratorial:**

Dependendo do estágio da doença em que o paciente se apresenta, o diagnóstico da doença de Chagas tem diferentes abordagens. Os métodos parasitológicos diretos têm grande utilidade na fase aguda da doença, quando a parasitemia é elevada e transitória. Na fase crônica, quando a parasitemia torna-se muito baixa, as técnicas sorodiagnósticas ganham grande importância na solução do problema.

Em relação ao diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, os métodos parasitológicos são de extrema especificidade (100%), pois o agente causal é, direta

ou indiretamente, demonstrado O diagnóstico parasitológico, quando positivo, não deixa margem para dúvidas, porém apresenta baixa sensibilidade durante a fase crônica (Chiari, 1992; Chiari & Galvão, 1997). Já os métodos sorológicos apresentam, via de regra, elevada sensibilidade, de 98 a 99%, se utilizados dois ou três testes, porém apresenta a desvantagem da menor especificidade (92 a 95%, conforme o teste). Em virtude de eventuais reações cruzadas e outras intercorrências, a utilização de testes sorológicos dá a probabilidade, e não a certeza do diagnóstico (Camargo, 1987).

### ***2.7.1- Métodos Parasitológicos:***

No infectado chagásico, para a pesquisa do parasita quando realizada na fase aguda, deve ser priorizada por exame direto, seja a fresco ou por métodos de concentração. Durante a fase crônica, a pesquisa do parasita é indicada para confirmação diagnóstica em casos de sorologia duvidosa, aferição da parasitemia visando ao tratamento tripanocida, controle de cura ou isolamento do parasita (WHO, 1991; Chiari, 1992) Na fase crônica o tipo de exame empregado difere dos utilizados na fase aguda, porque se baseia na multiplicação do parasita por hemocultura, xenodiagnóstico ou amplificação de ácidos nucléicos, PCR (Ministério da Saúde, 1997a).

#### ***2.7.1.1- Métodos Parasitológicos Diretos:***

Devem ser empregados em toda suspeita de fase aguda ou de reativação, por qualquer forma de transmissão. Pela sua simplicidade e elevado índice de resultados satisfatórios, o exame a fresco é o método mais recomendado. No caso de ausência de parasitas, recomenda-se o emprego das técnicas de concentração, seja pela microcentrifugação com observação da interfase, seja pelo método de Strout (Cerisola *et al.*, 1974 apud Luquetti & Rassi, 2000; Cançado, 1980 apud Luquetti & Rassi, 2000).

**2.7.1.1.1- A fresco** → o exame consiste na pesquisa do parasita a fresco, em sangue periférico, obtido por meio de punção digital ou sangue venoso incoagulável (heparinizado ou citratado). A gota de sangue é examinada entre lâmina e lamínula com aumento de 400 vezes, sendo necessário, no mínimo, examinar 200 campos microscópicos por

lâmina, para concluir sua negatividade. Os parasitas, refringentes, são visualizados pelos seus rápidos movimentos entre as hemácias, que são por ele deslocadas (Brener, 1961 apud Luquetti & Rassi, 2000);

**2.7.1.1.2- Micro-hematócrito** → o sangue incoagulável é centrifugado em tubo capilar como para micro-hematócrito. Depois da centrifugação, pode ser observado o tubo capilar em microscópio, na interfase entre o plasma e as hemácias (creme leucocitário). Alternativamente, o capilar pode ser cortado ao nível da interfase, sendo observado o creme leucocitário assim obtido, entre lâmina e lamínula (WHO, 1991; Ministério da Saúde, 1997b; Moya & Moretti, 1997);

**2.7.1.1.3- Técnica de concentração de Strout** → consiste na coleta de 5 a 10ml de sangue sem anticoagulante; submete-se o soro que exsuda do coágulo à dupla centrifugação, sendo a primeira a 160g durante três minutos. Em seguida transfere-se o sobrenadante resultante para outro tubo que é submetido a 400g durante cinco minutos. Após este processo o sobrenadante é desprezado e o sedimento examinado (Strout, 1962 apud Luquetti & Rassi, 2000).

**2.7.1.1.4- Uso de QBC** → é de utilização recente, sendo recomendado por alguns pesquisadores para utilização na pesquisa de plasmódios (Ferreira & Ávila, 1996; Amato-Neto *et al.*, 1996);

**2.7.1.1.5- Técnica de concentração de Ficoll-Hypaque (metrisamida)** → a técnica consiste em centrifugação do sangue heparinizado, sobre gradiente de metrisamida, a 400g durante 20 minutos. Deve-se procurar o parasita na interfase entre o plasma e a metrisamida, junto à camada de células mononucleares (Budzko & Kierszenhaum, 1974 apud Luquetti & Rassi, 2000);

**2.7.1.1.6- Lâmina corada** → não é aconselhável o uso deste método na rotina, visto que para observar parasitas por esta técnica, é necessário que exista parasitemia muito elevada (Rassi *et al.*, 1992);

**2.7.1.1.7- Gota espessa** → pode ser obtida seguindo a mesma técnica utilizada para pesquisa de hematozoários. Com essa técnica a morfologia do parasita sofre modificações que podem dificultar a sua identificação (Luquetti & Rassi, 2000).

#### **2.7.1.2- Métodos Parasitológicos Indiretos Não Moleculares:**

Sua utilização está indicada em diferentes circunstâncias. Na fase aguda, se os exames diretos tiverem sido negativos, pode ser utilizado o xenodiagnóstico com exame precoce dos triatomíneos (ente o 6° e o 10° dia após a aplicação) (Romaña & Briones, 1954 apud Luquetti & Rassi, 2000) e a hemocultura, em torno de 15 dias (Luquetti & Rassi, 2000). E na fase crônica, quando os resultados sorológicos obtidos forem duvidosos, ou existir a possibilidade de tratar-se de reação cruzada por leishmaniose, ou ainda quando for necessário estabelecer o nível parasitêmico, visando ao tratamento etiológico ou verificar a eficácia terapêutica de uma droga (Cançado *et al.*, 1973 apud Luquetti & Rassi, 2000; Rassi *et al.*, 1992; Rassi *et al.*, 1996; Chiari & Galvão, 1997; Russomando *et al.*, 1998).

**2.7.1.2.1- Xenodiagnóstico** → descrito inicialmente por Brumpt em 1914 (Brumpt, 1914 apud Luquetti & Rassi, 2000), visando otimizar os resultados sofreu sucessivas modificações a partir de estudos de (Dias, 1940; Maekelt, 1964; Schenone e cols., 1968; Cerisola e cols., 1974 apud Luquetti & Rassi, 2000) e outros autores. A técnica consiste basicamente na alimentação de ninfas do triatomíneo, virgens de infecção, com sangue do paciente. Se presente, o parasita multiplica-se no tubo digestivo do triatomíneo, e as fezes das ninfas são examinadas aos 30 e 60 dias após o repasto sangüíneo. O processo pode ser artificial, quando os triatomíneos são alimentados com sangue incoagulável do paciente, por meio de membranas apropriadas, ou natural, quando as ninfas são aplicadas na pele do paciente (Cedillos *et al.*, 1982; Isac, 1994). Existem outras variações, como a xenocultura, na qual se faz cultivo das fezes dos triatomíneos (Bronfen *et al.*, 1989; Bronfen & Alvarenga, 1991);



**2.7.1.2.2- Hemocultura** → vem sendo utilizada desde a década de 50, com resultados inicialmente inferiores aos obtidos com o xenodiagnóstico (Chiari & Galvão, 1997). Após o trabalho de Albuquerque e cols. em 1972 o Brasil retomou o interesse em sua utilização (Albuquerque *et al.*, 1972 apud Luquetti & Rassi, 2000). Embora nas publicações sobre o assunto a metodologia empregada tenha sido extremamente divergente, atualmente existe consenso quanto a algumas variáveis (Chiari & Galvão, 1997): o volume de sangue colhido não deve ser inferior a 20ml, sendo preferível o volume de 30ml. A heparina é o anticoagulante utilizado com maior frequência. O sangue incoagulável deve ser processado imediatamente, por meio de centrifugação realizada a 4°C, e separação do plasma, que contém os anticorpos potencialmente letais para os parasitas. O sangue, incluindo o creme leucocitário, deve ser semeado em vários tubos, em número não inferior a seis alíquotas. O meio que tem fornecido melhores resultados é o LIT. As culturas devem ser mantidas a 28°C. Durante vários meses, no mínimo quatro, a observação dessas culturas deve ser realizada mensalmente, procurando também formas amastigotas por meio de lâminas coradas (Minter-Goeldbloed, 1978 apud Luquetti e Rassi, 2000; Basso & Moretti, 1984);

**2.7.1.2.3- Inoculação de animais** → embora tenha sido utilizada com certa frequência em décadas passadas, tendo em vista fatores limitantes como a necessidade de biotério com animais isogênicos suscetíveis ao *T. cruzi*, esta técnica, hoje em dia é pouco usada como método de diagnóstico de rotina. (Oliveira *et al.*, 1993). Contudo é utilizada em laboratórios de pesquisa interessados no estudo experimental de cepas (Kipnis *et al.*, 1983).

### **2.7.1.3- Método Parasitológico Indireto Molecular:**

**2.7.1.3.1- PCR** → na década de 80 foram descritas sondas de DNA para detectar o parasita (Gonzalez *et al.*, 1984; Ashall *et al.*, 1988). Porém os maiores progressos tiveram lugar após a amplificação de fragmentos de minicírculos do DNA do cinetoplasto (Sturm *et al.*, 1989;

Ávila *et al.*, 1990; Veas *et al.*, 1991; Wincker *et al.*, 1994) ou de regiões do genoma nuclear do parasita (Moser *et al.*, 1989; Díaz *et al.*, 1992; Russomando *et al.*, 1992), por meio da técnica do PCR.

Esse procedimento permite obter sensibilidade elevada, podendo ser aplicado em amostras de sangue, ou fezes do triatomíneo (Breniere *et al.*, 1995; Russomando *et al.*, 1996), ou em outros materiais biológicos.

### **2.7.2- Métodos Sorológicos mais empregados na rotina diagnóstica:**

Durante a fase crônica, para facilitar o diagnóstico, doenças que cursam com baixo número do agente causal são diagnosticadas indiretamente, por meio da presença de anticorpos. Na fase crônica da doença de Chagas o método de eleição para o diagnóstico etiológico da doença é a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, tendo em vista que é o mais econômico, rápido e eficaz (Luquetti & Rassi, 2000).

Os testes sorológicos, em sua maioria, são ideais para uso em Bancos de Sangue, principalmente os imunoenzimáticos, porque preenche quase todos os requisitos necessários para um bom teste diagnóstico: são práticos, de baixo custo e capazes de processar grande número de amostras. Contudo persiste, nesses testes, o problema em relação à sensibilidade e especificidade. No caso da baixa sensibilidade o problema é o aparecimento de resultados falso-negativos, que aumentam os riscos de transmissão por transfusões de sangue e prejudicam o diagnóstico dos pacientes (Hoshino-Shimizu *et al.*, 1975; Anthony *et al.*, 1979; Carrasco *et al.*, 1985).

Já a baixa especificidade apresenta como consequência os resultados falso-positivos, devido às reações inespecíficas ou reações cruzadas com outras infecções, pelas quais um estímulo antigênico similar, embora não idêntico, pode gerar anticorpos que sejam detectados nos métodos utilizados e interpretados como resultado positivo. Essas reações cruzadas já foram observadas com as leishmanioses e o *Trypanosoma rangeli*, assim como também na sífilis, toxoplasmose, hepatite, lupus eritematoso sistêmico, lepra, esquistossomose, artrite

reumatóide, paracoccidioidomicose e mononucleose (Hoshino-Shimizu *et al.*, 1975; Anthony *et al.*, 1979; Carrasco *et al.*, 1985; Luquetti & Rassi, 2000).

Embora a sorologia seja o método de eleição para o diagnóstico laboratorial, ela apresenta algumas limitações, inerentes à sua própria natureza. Como não existe método ideal, devemos solicitar pelo menos duas técnicas de princípios diferentes, visto que a soma dos métodos existentes permite melhorar o diagnóstico (WHO, 1991; Luquetti & Rassi, 2000).

Nos testes sorológicos, podemos usar diferentes antígenos, que podem ser preparados por diferentes procedimentos. Habitualmente, utiliza-se antígeno preparado em cultivos de *T. cruzi* em diferentes meios, principalmente líquidos, como o meio LIT, na forma epimastigota com um pequeno percentual de formas tripomastigotas. Frequentemente se usam cepas de fácil crescimento em cultivo, como as cepas Y e Tulahuen, entre outras. Antígenos preparados dessa forma, sem purificação posterior, são conhecidos como antígenos não-purificados (extrato bruto, antígeno cru) (Stolf, 1992). Além desses, podemos usar: antígenos purificados; antígenos excretados; utilizar como antígeno, diferentes cepas de *T. cruzi*; ou antígenos específicos das diferentes formas evolutivas.

**2.7.2.1- RFC** → descrito por Guerreiro e Machado em 1913, o RFC foi o primeiro método sorológico para detectar a infecção pelo *T. cruzi*, utilizado até recentemente por todos os laboratórios (Guerreiro & Machado, 1913 apud Luquetti & Rassi, 2000). Com o surgimento de testes de execução mais fácil e de padronização simplificada, como foram a imunofluorescência e a hemaglutinação, ele foi sendo progressivamente abandonado (Luquetti & Rassi, 2000);

**2.7.2.2- DAT** → usado principalmente por pesquisadores argentinos (Vattuone & Yanovsky, 1971 apud Luquetti & Rassi, 2000) e chilenos (González *et al.*, 1986). Após tratamento do soro com 2-ME, consiste na aglutinação de epimastigotas obtidos de cultura, tripsinizados e formolizados (Storni *et al.*, 1975 apud Luquetti & Rassi, 2000);

**2.7.2.3- HAI** → amplamente utilizado desde 1962 (Cerisola *et al.*, 1962 apud Luquetti & Rassi, 2000; Knierim & Saavechs, 1966 apud Luquetti &

Rassi, 2000; Neal & Miles, 1970 apud Luquetti & Rassi, 2000), este teste foi padronizado por Camargo e cols. (Camargo *et al.*, 1971 apud Luquetti & Rassi, 2000); a sua difusão se deve à facilidade de execução, rapidez de leitura (uma a duas horas) e por não necessitar de equipamentos adicionais.

O processo consiste na diluição progressiva dos soros em microplacas de poliestireno com 96 poços, de fundo em “V” ou em “U”, com capacidade de 0,25ml por poço, às quais se adiciona o antígeno, constituído pelas hemácias sensibilizadas. Decorrida uma a duas horas realiza-se a leitura da imagem obtida em cada poço. Quando existem anticorpos, estes provocam a sedimentação das hemácias em “tapete” que cobre todo o fundo do poço, de cor vermelha tênue. Já as reações negativas são visualizadas como imagens puntiformes de hemácias sedimentadas no fundo do poço, de cor vermelha intensa (Luquetti & Rassi, 2000).

Existem dois reagentes adicionais que, em geral, são incluídos no conjunto diagnóstico: hemácias não-sensibilizadas e 2-ME. O reagente hemácias não sensibilizadas é utilizado quando se suspeita de reação inespecífica, devida à presença de anticorpos anti-hemácia. Alguns soros aglutinam hemácias não-sensibilizadas, motivo pelo qual, nesses casos, o resultado positivo obtido não terá valor. Já a presença de “aglutininas naturais”, freqüentemente da classe IgM, pode também produzir a aglutinação de hemácias e esses anticorpos são eliminados, quando se incuba o soro previamente com o reagente 2-ME (Luquetti & Rassi, 2000).

Existem diversas variedades descritas de HAI, utilizando hemácias de diferentes espécies (humana, de ave, de carneiro, etc.), assim como métodos de sensibilização e origem dos antígenos; no Brasil tem sido empregada a cepa Y; na Argentina, a cepa Tulahuen e, no México, cepas isoladas nesse país (Monteón *et al.*, 1995).

**2.7.2.4- IFI** → utilizado mundialmente desde 1950, para o diagnóstico sorológico de diversas doenças infecciosas; este teste permite, com o auxílio de microscópio com luz ultravioleta, utilizar apenas um reagente, o conjugado de anticorpo anti-IgG humano com isotiocianato de fluoresceína para as diferentes doenças, com variação apenas do antígeno a ser utilizado (Fife &

Muschel, 1959 apud Luquetti & Rassi, 2000). No nosso meio, a sua difusão para a doença de Chagas se deve principalmente aos trabalhos de Camargo, que o padronizou (Camargo, 1966 apud Luquetti & Rassi, 2000).

Consiste na incubação, durante 30 minutos, a 37°C, do soro com epimastigotas de cultivo fixados a uma lâmina de microscopia convenientemente demarcada. Após lavagens sucessivas, procede-se à incubação com conjugado (produzido em diferentes animais, como: cabra, coelho e outros), nas mesmas condições anteriores, seguidas de novas lavagens e montagem com glicerina tamponada e lamínula. Posteriormente, realiza-se a leitura em microscópio de fluorescência, cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína, presente apenas nos parasitas que apresentam anticorpos ligados à sua superfície. Os epimastigotas apresentam coloração verde-maça. Na ausência de anticorpos, os parasitas permanecem com coloração vermelho-tijolo, tênue.

A extrema sensibilidade constitui a grande vantagem deste método, proporcionando títulos elevados de anticorpos nos soros da população infectada. As reações cruzadas com leishmaniose são constantes embora, como assinalado por Camargo e Rebonato (Camargo & Rebonato, 1969 apud Luquetti & Rassi, 2000) e confirmado por outros, os títulos obtidos por IFI utilizando antígeno de leishmânia sejam menores que com *T. cruzi*.

**2.7.2.5- Testes Imunoenzimáticos** → após a introdução do ELISA, estes testes passaram a ter ampla aplicação na detecção de anticorpos (Engvall & Perlmann, 1972 apud Luquetti & Rassi, 2000) cabendo a Voller e cols. (Voller *et al.* 1975 apud Luquetti & Rassi, 2000) a sua aplicação no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

Consiste na adsorção de antígeno de *T. cruzi* a microplacas de microtitulação, onde são adicionados os soros, em diluição única (1:100 ou 1:200). Após incubação e lavagem, adiciona-se o conjugado composto por anticorpo anti-IgG humana e uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina). Depois de nova incubação e lavagem, adiciona-se o substrato (peróxido de hidrogênio) e o cromógeno, substância incolor que adquire coloração sob ação do substrato. Após 30 minutos essa reação é interrompida, adicionando-se ácido sulfúrico ou outras

soluções que modificam o pH. Em seguida, procede-se à leitura da intensidade da cor obtida em cada poço, que pode ser aferida a olho nu (leitura subjetiva), ou melhor, com auxílio de espectrofotômetro, que indica a reatividade de cada cavidade em D.O., obtendo-se uma medida objetiva do fenômeno.

O antígeno utilizado origina-se de culturas de epimastigotas, mas também podem ser empregadas frações do parasita, ou culturas de outras formas evolutivas. Os cromógenos mais utilizados são a OPD e o TMB. No comércio existem variedades, com utilização de pérolas no lugar de microplacas, em geral diminuindo o tempo total de execução do teste. Também podem ser utilizados outros suportes, tais como membranas de nitrocelulose (Hubsch *et al.*, 1988; Lissaldo *et al.*, 1994).

Uma das vantagens do ELISA é a de que o resultado é expressão direta da capacidade de ligação dos anticorpos, de uma forma contínua, e não por titulação como a obtida por HAI e IFI. A intensidade da cor indicará a concentração de anticorpos existentes na amostra do soro (Camargo, 1987). Possui elevada sensibilidade com especificidade variável.

### **2.7.3- Métodos Sorológicos Empregando Proteínas Recombinantes ou Peptídeos Sintéticos:**

Em relação aos antígenos recombinantes (AR), podemos dizer que a triagem de bibliotecas de cDNA de *T. cruzi* com soro de pacientes ou com soro hiperimune de animais de experimentação permitiu encontrar muitos genes que codificam antígenos de elevada reatividade com soros de pacientes na fase crônica (Ibañez *et al.*, 1988; Hoft *et al.*, 1989; Miles & Clarke, 1989; Moncayo & Luquetti, 1990; Frasch & Reyes, 1990; Silveira, 1992; Frasch *et al.*, 1994).

A OMS, através do TDR, realizou um estudo com alguns antígenos que são usados para o diagnóstico da doença de Chagas. Foram avaliadas três frações purificadas (GP 57/51, GP90 e neuraminidase) que apresentaram baixa sensibilidade e a GP90 que apresentou também baixa especificidade; e 18 proteínas recombinantes de nove laboratórios diferentes que apresentaram alta sensibilidade e especificidade (Luquetti, 1990; Moncayo & Luquetti, 1990). Em outro estudo realizado pelo CYTED foram avaliadas 10 proteínas recombinantes, algumas das

quais, mostraram até 100% de especificidade e 97,3% de sensibilidade e outras, não foram reconhecidas por nenhum dos soros (Levin, 1991).

Alguns AR foram isolados por grupos diferentes, mas praticamente idênticos, como o Ag1, o FRA, o JL7 e o H49. O mesmo aconteceu com outros, como o Ag30, o CRA, o JL8, o TCR27; e o Ag2 com o TCR39 e o B13 (Tabela 2). Uma característica presente em muitos dos genes clonados, que foi verificada por seqüenciamento, é a presença de minirepetições *em tandem* de seqüências que codificam epitopos repetitivos (Frasch *et al.*, 1991).

O SAPA é outro antígeno recombinante de interesse. Ele se encontra exposto no parasita durante a fase aguda onde é excretado, não se achando presente nos parasitas circulantes da fase crônica. O interessante é que esse antígeno aparece novamente quando o parasita é transferido a outro indivíduo, como acontece na transmissão congênita (Reyes *et al.*, 1990). Portanto, embora anticorpos contra ele possam eventualmente ser encontrados em soro de pacientes na fase crônica, ele seria um antígeno característico da fase aguda. Foi descrito outro antígeno que também estaria neste grupo, o A13 (Tabela 2).

A partir dos antígenos recombinantes, foram sintetizados peptídios, com aumento de especificidade, mas com conseqüente perda de sensibilidade, motivo pelo qual devem ser usados junto com outros antígenos. Os mais conhecidos são: o PEP2 e o TcD, que foram usados em testes de ELISA aumentando a sensibilidade para 99,4% com uma especificidade de 98% (Peralta *et al.*, 1994; Guevara *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 1999; Oelemann *et al.*, 1999). Eles também podem ser usados como marcadores de forma clínica (Levin *et al.*, 1990; Levin, 1991; Aznar *et al.*, 1995). Além desses temos: o R-13 (Aznar *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 2002) e o TcE (Guevara *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 1999). A Tabela 2 abaixo faz uma sinopse dos antígenos recombinantes/peptídeos descritos para o diagnóstico da doença de Chagas, algumas características do antígeno e a fase da doença onde o antígeno foi experimentado.

Tabela 2. Proteínas recombinantes mais conhecidas.

Clone	Unidades de repet. de aminoácidos	Proteína nativa (kDa)	Diagnóstico (infecção)	Referências
A13	Não repetitivo	230	Aguda, congênita e Crônica	Paranhos et al., 1990 Levin et al., 1991 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999
Ag1	68	>205	Crônica	Ibañez et al., 1988 Lorca et al., 1992 Vergara et al., 1992 Pastini et al., 1994
Ag2	12	85	Crônica	Ibañez et al., 1988 Levin et al., 1991 Lorca et al., 1992 Vergara et al., 1992 Pastini et al., 1994
Ag13				Levin et al., 1991 Lorca et al., 1992 Pastini et al., 1994
Ag26				Lorca et al., 1992
Ag30	14	160-225	Crônica	Ibañez et al., 1988 Lorca et al., 1992 Vergara et al., 1992 Pastini et al., 1994
Ag36				Lorca et al., 1992 Vergara et al., 1992
Ag54				Lorca et al., 1992
B12				Zingales et al., 1990 Gruber e Zingales, 1993
B13	12	Indeterminada	Crônica	Zingales et al., 1990 Gruber e Zingales, 1993 Umezawa et al., 1996 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999 Iwai et al., 2001
cy-hsp70				Krautz et al., 1998



Continuação da Tabela 2.

Clone	Unidades de repet. de aminoácidos	Proteína nativa (kDa)	Diagnóstico (infecção)	Referências
CRA	14	225	Crônica	Laffaille et al., 1989 Almeida et al., 1990 Krieger et al., 1992 Gomes et al., 2001
1F8	Não repetitivo	24	Crônica	Gonzalez et al., 1985 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999
F1-160				Cetron et al., 1992
FRA	68	>300	Crônica	Laffaille et al., 1989 Almeida et al., 1990 dos Santos et al., 1992 Krieger et al., 1992 Gomes et al., 2001
grp78				Krautz et al., 1998
H49	68	>300	Crônica	Cotrim et al., 1990 Levin et al., 1991 Paranhos et al., 1994 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999
JL5	Não repetitivo	38	Forma clínica	Levin et al., 1989 Levin et al., 1991
JL7	68	>170	Crônica	Levin et al., 1989 Levin et al., 1991 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999
JL8	14	>170	Crônica	Levin et al., 1989 Levin et al., 1991 Umezawa e Silveira, 1999 Umezawa et al., 1999
JL9				Levin et al., 1991
mt-hsp70				Krautz et al., 1998
RAI				Levin et al., 1991

Continuação da Tabela 2.

Clone	Unidades de repet. de aminoácidos	Proteína nativa (kDa)	Diagnóstico (infecção)	Referências
rTc24				Godsel et al., 1995 Krautz et al., 1995 Passos et al., 1997 Krautz et al., 1998 Guevara et al., 1999
SA 85-1.1				Cetron et al., 1992
SA 85-1.2				Cetron et al., 1992
SAPA	12	160-205	Aguda e congênita	Affranchino et al., 1989 Levin et al., 1991 Lorca et al., 1992 Vergara et al., 1992 Pastini et al., 1994 Brenière et al., 2002
TcF				Houghton et al., 2000 Ferreira et al., 2001
TCR27	14	Indeterminada	Crônica	Hoft et al., 1989
TCR39	12	82	Crônica	Hoft et al., 1989
TESA			Crônica	Umezawa et al., 1996 Nakazawa et al., 2001 Matsumoto et al., 2002
TESA-1			Crônica	Matsumoto et al., 2002

O uso de ARs com epitopos repetitivos ou de peptídeos sintéticos tem a desvantagem de que, embora aumentem a especificidade para níveis próximos a 100%, a sensibilidade individual é mais baixa, pois nem todos os indivíduos infectados sintetizam anticorpos contra esses AR. Para melhorar a sensibilidade, a tendência tem sido a de utilizar vários ARs em proporções variáveis, já que o uso de apenas um AR não identificaria todos os infectados (Krieger *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1993). O par de antígenos CRA/FRA (antígenos repetitivos do citoplasma e do flagelo) apresentou 100% de sensibilidade e especificidade pelo teste de ELISA (Krieger *et al.*, 1992). Para contrabalançar a possível perda diagnóstica de alguns infectados, que não apresentam em seus soros anticorpos contra os AR, aconselha-se a utilização simultânea de testes com antígeno bruto,

preferencialmente de elevada sensibilidade, fato esse muito importante para Bancos de Sangue, que devem trabalhar com a maior sensibilidade possível (Luquetti & Rassi, 2000).

Atualmente, vários pesquisadores continuam procurando um único antígeno do *T. cruzi* que permita o desenvolvimento de um ensaio sensível e altamente específico, com preferencialmente vários epitopos distintos, que possa ser reconhecido por todos os pacientes com doença de Chagas. Existem duas linhas de pesquisa que seguem esse objetivo: uma delas busca esse antígeno entre as proteínas HSP, que são fortemente reconhecidas em diversas infecções no homem e em animais experimentais (Andrade & Andrade, 1996); e uma outra, que busca um polipeptídeo antigênico específico entre as demais proteínas.

### 3- Referências Bibliográficas

- Affranchino, J.R., Ibanez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Pettersson, U., Frasc, A.C.C.** (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas` disease. *Mol Biochem Parasitol*, 34: 221-228.
- Almeida, E., Krieger, M.A., Carvalho, M.R., Oelemann, W., Goldenberg, S.** (1990). Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85(4): 519-522.
- Amato Neto, V.** (1993). Conduta frente ao doador chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop*, 26 (2): 86-87.
- Amato Neto, V., Matsubara, L., Lanura, P.N.** (1996). Avaliação do sistema quantitative buffy coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em método experimental murino. *Rev Soc Bras Med Trop*, 29: 59-61.
- Andrade, P.P., Andrade, C.R.** (1996). Heat shock proteins in Leishmaniasis. In: *Stress proteins in medicine* (Van-Willem E., Young DB. eds.) Marcel Dedder, New York, pp. 307-325.
- Anthony, R.L., Johnson, C.M., Souza, O.E.** (1979). Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg*, 28: 969-973.
- ANVISA,** (2000). Relatório de produção do Brasil. Público. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Ashall, F., Yip-Chuck D.A.M., Luquetti, A.O., Miles, M.A.** (1988). Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. *J Clin Microbiol*, 26: 576-578.
- Ávila, H., Gonçalves, A.M., Nehme, N.C., Morel, C.M., Simpson, L.** (1990). Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol*, 42: 175-188.

- Aznar, C., Lopes-Bergami, P., Brandariz, S., Mariette, C., Liegeard, P., Alves, M.D., Barreiro, E.L., Carrasco, R., Lafon, S., Kaplan, D.** (1995). Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 12: 231-238.
- Barreto, M.P., Brener, Z., Andrade, Z.A.** (1979). Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., pp. 89-291.
- Basso, B., Moretti, E.R.** (1984). Detección del *Trypanosoma cruzi* por hemocultivo en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Medicina (B. Aires)*, 44: 41-47.
- Brener, Z.** (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol*, 27: 347-382.
- Brener, Z.** (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: comment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81: 527.
- Breniere, S.F., Bosseno, M.F., Telleria, J., Carrasco, R., Vargas, F., Yaksic, N., Noireau, F.** (1995). Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg*, 53: 179-184.
- Breniere, S.F., Bosseno, M.F., Noireau, F., Yaesik, N., Liegeard, P., Aznar, C., Hhontebeyrie, M.** (2002). Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(3): 289-295.
- Bronfen, E., Rocha, F.S.A., Machado, G.B.N., Perillo, M.M., Romãña, A.J., Chiari, E.** (1989). Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84: 237-240.
- Bronfen, E., Alvarenga, N.J.** (1991). O xenodiagnóstico e os critérios para avaliar o nível de parasitemia do paciente chagásico crônico. *Rev Soc Bras Med Trop* 24: 37-42.

- Camargo, M.E.** (1987). Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Ars Curandi Cardiol*, 9: 29-38.
- Carlier, Y., Luquetti, A.O., Dias, J.C.P., Truyens, C., Kirchhoff, L.** (2002). Chagas disease (American Trypanosomiasis). *eMedicine J*, 3 (3): 1-23.
- Carrasco, R.L., Breniere, S.F., Poch, O., Miguez, H.V., Sealaes, H., Anatezana, G., Desjeux, P., Carlier, Y.** (1985). Chagas serology and its problems. *Ann Soc Belg Med Trop*, 65: 79-84.
- Carvalho, M.R., Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Shikanal-Yassuda, M.A., Ferreira, A.W., Pereira, J.B., Sáez-Alquézar, A., Dorlhiac-Llacer, P.E., Chamone, D.F., Goldenberg, S.** (1993). Chagas disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*, 33: 830-834.
- Castro Filho, J., Silveira, A.C.** (1984). Distribuição da doença de Chagas no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*, 31: 85-97.
- Cedillos, R.A., Torrealba, J.W., Tonn, R.J., Mosca, W., Ortegón, A.** (1982). El xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. *Bol Of Sanit Panam*, 93: 240-249.
- Cerisola, J.A., Rabinovich, A., Alvarez, M., Di Corleto, C.A., Pruneda J.** (1972). Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol Of Sanit Panam*, 73: 203-221.
- Cetron, M.S., Hoff, R., Kahn, S., Eisen, H., Van Voorhis, W.C.** (1992). Evaluation of recombinant trypanomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas` disease. *Acta Trop*, 50(3): 259-266.
- Chagas, C.** (1909). Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1(2): 159-218.
- Chagas, C.** (1916). Processos patogênicos da tripanosomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 8: 5-37.

- Chagas, C.** (1936). Infection expérimentale de l'homme par le *Schizotrypanum cruzi*. *C R Seances Soc Biol Fil*, 121: 769-771.
- Chiari, E.** (1992). Parasitological diagnosis. In: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E., Rassi A. (eds). *Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, pp. 153-164.
- Chiari, E., Galvão, L.M.C.** (1997). Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In: Dias J.C.P., Coura J.R. *Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 85-97.
- Corliss, J.O.** (1994). An interim utilitarian (user-friendly) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool*, 33: 1-51
- Cotrim, P.C., Paranhos, G.S., Mortara, R.A., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M.E., Franco da Silveira, J.** (1990). Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human Chagasic sera. *J Clin Microbiol*, 28: 519-524.
- Coura, J.R., Nogueira, E.S., Silva, J.R.** (1966). Índices de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue de doadores na fase crônica da doença. *O Hospital*, 69: 115-122.
- De Souza, W.** (2000). O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., pp. 88-119.
- Dias, J.C.P.** (1979a). Mecanismos de transmissão. In: Brener, Z., Andrade, Z.A., (eds.) *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed, pp. 152-174.
- Dias, J.C.P.** (1979b). Mecanismos de transmissão. In: Brener Z., Andrade, Z.A., (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed, pp. 292-294.

- Dias, J.C.P.** (1985). Cardiopatia chagásica: história natural. In: Cançado J.R., Chuster M. (eds). *Cardiopatia chagásica*. Belo Horizonte, MG: Fundação Carlos Chagas de Pesquisa Médica, pp. 99-113.
- Dias, J.C.P.** (1987). Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*, 3: 336-341.
- Dias, J.C.P.** (1988). Reseña histórica de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y socio-economicos de la endemia en el contexto latinoamericano. *Rev Fed Argent Cardiol*, 29: 129-135.
- Dias, J.C.P.** (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*, 22: 147-156.
- Dias, J.C.P.** (1992). Chagas disease and blood transfusion in endemic areas. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A., (eds.). *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*, pp. 135-142.
- Dias, J.C.P.** (1997). Controle da doença de Chagas. In: Dias, J.C.P., Coura, J.R. (eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, pp. 453-468.
- Dias, J.C.P.** (1998). Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. *Cad Saude Publica*, 14: 19-37.
- Dias, J.C.P., Brener, Z., Macedo, M.A.M.** (1986). Quimioprofilaxia da doença de Chagas induzida por transplante renal com doador infectado. *Rev Bras Med*, 43: 39-43.
- Dias, J.C.P., Schofield, C.J.** (1999). The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(I): 103-221.
- Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L., Vinhaes, M.C.** (2000). Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica*, 16: 1-30.



- Díaz, C., Nussenzweig, V., Gonzáles A.** (1992). An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg*, 46: 616-623.
- Dos Santos, C.N., Krieger, M.A., Almeida, E., Lafaille, J.J., Goldenberg, S., Galler, R.** (1992). *Trypanosoma cruzi* flagellar repetitive antigen expression by recombinant baculovirus: towards an improved diagnostic reagent for Chagas` disease. *Biotechnology*, 10(11): 1474-1477.
- Fernandes, A.J., Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., Romanha, A.J., Chiari, E.** (1994). Interrelações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*, 10: 473-480.
- Ferreira, A.W., Ávila, S.L.M.** (1996). *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Ferreira, A.W., Belém, Z.R., Lemos, E.A., Reed, S.G., Campos-Neto, A.** (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas` disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol*, 39(12): 4390-4395.
- Fiusa-Lima, J.T., Silveira, A.C.** (1984). Controle da transmissão e inquérito sorológico nacional. In: *Cardiopatía Chagásica* (J. R. Cançado & M. Chuster, org.), pp. 371-380, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas.
- Frasch, A.C.C., Reyes, M.B.** (1990). Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. *Parasitol Today*, 6: 137-140.
- Frasch, A.C.C., Cazzulo, J.J., Aslund, L., Petterson, U.** (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol Today*, 7(6): 148-151.
- Frasch, A.C.C., Reyes, M.B., Sánchez, D.O.** (1994). Diagnóstico de la enfermedad de Chagas: presente y futuro. In: *La enfermedad de Chagas y el sistema nervioso*. Washington: OPAS Pub Sci, 547: pp. 53-60.
- Fundação Hemope – Hemocentro de Pernambuco** (2002). Dados estatísticos da Triagem Sorológica da Fundação Hemope, sobre uma população total de 336.845 doadores.

- Godsel, L.M., Tibbetts, R.S., Olson, C.L., Chaudoir, B.M., Engman, D.M.** (1995). Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol*, 33: 2082-2085.
- Gomes, Y.M., Pereira, V.R., Nakazawa, M., Rosa, D.S., Barros, M.D., Ferreira, A.G., Silva, E.D., Ogatta, S.F., Krieger, M.A., Goldenberg, S.** (2001). Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(4): 497-501.
- Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N., Lizardi, P.M.** (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 3356-3360.
- Gonzalez, A., Lerner, T.J., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N., Lizardi, P.M.** (1985). Apparent generation of a segmented m RNA from two separate tandem families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*, 13: 5789-5804.
- Gonzales, J., Araya, J., Sagua, H., Miranda, N., Garcia, C., Mancilla, E.** (1986). Reacción de aglutinación directa con 2 mercaptoetanol en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas inaparente. *Parasitol Dia*, 10: 125-128.
- Gruber, A., Zingales, B.** (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas` disease. *Exp Parasitol*, 76(1): 1-12.
- Guevara, A.G., Ruiz, J.C., Houghton, R.L., Reynolds, L., Sleath, P., Benson, D. Ouaisi, A., Guderian, R.H.** (1999). Evaluation of a recombinant protein (R<sub>T</sub>C<sub>24</sub>) and synthetic peptides in anti-*Trypanosoma cruzi* positive samples from blood bank donors in chagasic endemic areas of Ecuador. *J Trop Med Hyg*, vol. 27(1) pp. 19-22.
- Guia de Vigilância Epidemiológica.** In: *Doença de Chagas*, cap. 5.7, pp. 1-12. Programa de Controle da Doença de Chagas-Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional de Saúde/ MS.

- Hagar, J.M., Rahimtoola, S.H.** (1995). Chagas` heart disease. *Curr Prob Cardiol*, 10: 825-928.
- Hoft, D.F., Kim, K.S., Otsu, K., Moser, D.R., Yost, W.J., Blumin, J.H., Donelson, J.E., Kirchhoff, L.V.** (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun*, 57: 1959-1967.
- Hoshino-Shimizu, S., Camargo, M.E., Umezawa, E.S.** (1975). A rapid slide flocculation test for diagnosis of American trypanosomiasis using *Trypanosoma* fragments preserved by lyophilization. *Am J Trop Med Hyg*, 24: 586-589.
- Houghton, R.L., Benson, D.R., Reynolds, L.D., McNeill, P.D., Sleath, P.R., Lodes, M.J., Skeiky, Y.A., Leiby, D.A., Badaro, R., Reed, S.G.** (1999). A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis*, 179(5): 1226-1234.
- Houghton, R.L., Benson, D.R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y.A.W., Badaró, R., Krettli, A.U., Reed, S.G.,** (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J Infec Dis* 181: 325-330.
- Hubsch, R.M., Chiechie, N., Comach, G., Aldao, R.R., Gusmão, R.D.A.** (1988). El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) em el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigênicas de *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 83: 277-285.
- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes, M.B.M, Leguizamón, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Petterson, U., Frasc, C.A.** (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated aminoacid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol*, 30: 27-34.
- Iniciativa del Cono sur.** VI Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis

americana transfusional. *Oficina Sanitaria Panamericana OPS/HCP/HCT* /97.91.

**Isac, E.** (1994). Influência da heparina e do citrato de sódio no xenodiagnóstico artificial. *Rev Patol Trop*, 23: 121-143.

**Iwai, L.K., Duranti, M.A., Abel, L.C., Juliano, M.A., Kalil, J., Juliano, L., Cunha-Neto, E.** (2001). Retro-inverso peptide analogues of *Trypanosoma cruzi* B13 protein epitopes fail to be recognized by human sera and peripheral blood mononuclear cells. *Peptides*, 22(6): 853-860.

**Kipnis, T.L., Minóprio, P.M., Luquetti, A.O., Rassi, A., Silva, A., Dias, W.D.** (1983). Estudo imunobiológico de estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 16: 175-183.

**Krautz, G.M., Galvão, L.M., Cançado, J.R., Guevara-Espinoza, A., Ouaiissi, A., Krettli, A.U.** (1995). Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas` disease. *J Clin Microbiol*, 33(8): 2086-2090.

**Krautz, G.M., Peterson, J.D., Godsel, L.M., Krettli, A.U., Engmann, D.M.** (1998). Human antibody responses to *Trupanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am J Trop Med Hyg*, 58(2): 137-143.

**Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Lafaille, J.J., Pereira, J.B., Krieger, H., Carvalho, M.R., Goldenberg, S.** (1992). Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*, 46: 427-434.

**Laffaille, J.J., Linss, J., Krieger, M.A., Souto-Padrón, T., Souza, W., Goldenberg, S.** (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol*, 35: 127-136.

**Laranja, F.S.** (1953). Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. *Rev Bras Med*, 10: 482-491.

- Laranja, F.S., Dias, E., Nóbrega, M.D., Miranda, A.** (1956). Chagas disease. A clinical, epidemiologic, and pathological study. *Circulation*, 14: 1035-1060.
- Levin, M.J.** (1991). Molecular Mimicry and Chagas` heart disease: high anti R-13 autoantibody levels are markers of severe Chagas heart complaint. *Res Immunol*, 142: 157-159.
- Levin, M.J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P.A., Ruiz, A.M., Kahn, A.** (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas` heart disease. *Am J Trop Med Hyg*, 41: 530-538.
- Levin, M.J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon, S., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Finkielstein, C., Chiale, P., Schejtman, D., Hontebeyrie-Joskowicz, M.** (1990). Autoantibodies in Chagas` heart disease: possible markers of severe Chagas heart complaint. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85: 539-543.
- Levin, M.J., Franco da Silveira, J., Frasc, A.C., Camargo, M.E., Lafon, S., Degrave, W.M., Rangel-Aldao, E.** (1991). Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas` disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 4(1): 11-9.
- Lissaldo, A.M., Hoshino Shimizu, S., Umezawa, E.S., Stolf, A.M.S.** (1994). Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to Dot-ELISA. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 36: 163-166.
- Lorca, M., Gonzalez, A., Veloso, C., Reyes, V., Vergara, U.** (1992). Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas` disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am J Trop Med Hyg*, 46(1): 44-49.
- Luquetti, A.O.** (1990). Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis multicentre trial serological and technical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85: 497-505.
- Luquetti, A.O., Rassi, A.** (2000). Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., pp. 360-361.

- Macedo, V.** (1980). Forma indeterminada da doença de chagas. *J Bras Med*, 38: 34-40.
- Marin-Neto, J.A., Simões, M.V., Sarabanda, A.V.L.** (2000). Forma crônica cardíaca. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., p. 268.
- Matsumoto, T.K., Cotrim, P.C., da Silveira, J.F., Stolf, A.M., Umezawa, E.S.** (2002). *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42(3); 187-192.
- Miles, M.A., Clarke, J.L.** (1989). Immunoselection techniques for cloning DNA-encoding parasite-specific antigens. *Parasitol Today*, 5: 25-27.
- Ministério da Saúde.** (1997a). *Tratamento etiológico da doença de Chagas*. 2ª ed. Brasília: Ed. Fundação Nacional de Saúde, Manual, 32 pp.
- Ministério da Saúde.** (1997b). Fundação Nacional de Saúde, Gerência Técnica de doenças de Chagas. Normas de segurança para infecções acidentais com o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. *Rev Patol Trop*, 26: 129-130.
- Minter-Goeldbloed, E.** (1978). The primary isolation by haemoculture of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* from animals and man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 72: 22-30.
- Moya, P., Moretti E.R.A.** (1997). Doença de Chagas congênita. In: Dias J.C.P., Coura J.R. (eds.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, pp. 383-410.
- Moncayo, A.** (1999). Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. *Medicina (B Aires)* 59 (Suppl 2): 120-124.

- Moncayo, A., Luquetti, A.O.** (1990). Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85: 489-495.
- Monteón, V.M., Guzmán, B.C., Florián, V.J., Ramos E.A., Velasco, C.O., Reyes, P.A.** (1995). Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas: autosuficiencia y concordancia interlaboratorios. *Salud Publica Mex*, 37: 232-235.
- Moser, D.R., Kirchhoff, L., Donnelson, J.E.** (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* By DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27: 1477-1482.
- Nakazawa, M., Rosa, D.A.S., Pereira, V.R.A., Moura, M.O., Furtado, V.C., Souza, W.V., Barros, M.N.D.S., Abath, F.G.C., Gomes, Y.M.** (2001). Esecretory-Secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of Chronic Chagas` Disease. *Am Soc Microbiol*, pp. 1024-1027.
- Oelemann, W.M., Vanderborght, B.O., Veríssimo da Costa, G.C., Teixeira, M.G., Borges-Pereira, J., De Castro, J.A., Coura, J.R., Stoops, E., Hulstaert, F., Zrein, M., Peralta, J.M.** (1999). A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas` disease. *Transfusion*, 39(7): 711-717.
- Oliveira, E.C., Stefani, M.M.A., Luquetti, A.O., Vêncio, E.F., Moreira, M.A.R., Souza, C., Rezende, J.M.** (1993). *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas` disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac from. *Rev Soc Bras Med Trop*, 26: 25-33.
- (OPAS) Organización Panamericana de la Salud.** (1995). Estadísticas de salud de las Américas. *OPAS Pub Sci*, 556: p. 352.
- Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Mortara, R.A., Rassi, A., Corral, R., Freilij, H.L., Grinstein, S., Wanderley, J., Camargo, M.E., Silveira, J.F.** (1990). *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Exp Parasitol*, 71: 284-293.

- Paranhos-Bacalla, G.S., Santos, M.R., Cotrim, P.C., Rassi, A., Jolivet, M., Camargo, M.E., Da Silveira, J.F.** (1994). Detection of antibodies in sera from Chagas` disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol*, 16(3): 165-169.
- Passos, V.M., Volpini, A.C., Braga, E.M., Lacerda, P.A., Ouaiissi, A., Lima-Martins, M.V., Krettli, A.U.** (1997). Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92(6): 791-793.
- Pastini, A.C., Iglesias, S.R., Carricarte, V.C., Guerin, M.E., Sanchez, D.O., Frasc, A.C.** (1994). Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas disease. *Clin Chem*, 40(10): 1893-1897.
- Peralta, J.M., Teixeira, M.G., Shreffler, W.G., Pereira, J.B., Burns Jr., J.M., Sleath, P.R., Reed, S.G.** (1994). Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*, 32: 971-974.
- Portaria 721/89, ANVISA-ME.** Normas técnicas em hemoterapia. 25 pp.
- Rassi, A., Luquetti, A.O., Rassi, Jr A., Rassi, S.G.** (1992). Chagas disease-clinical features. In: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E., Rassi A. (eds.). *Chagas disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, pp. 81-101.
- Rassi, A., Luquetti, A.O.** (1992). Therapy of Chagas disease. In: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E., Rassi A. (eds.). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, pp. 237-247.
- Rassi, A., Luquetti, A.O., Rassi, Jr. A., Rassi, G.G., Silva, I.G., Naves, H.A.M., Carvalho, E.S.D.** (1996). Tentativa de tratamento da infecção chagásica crônica humana com alopurinol. *Rev Soc Bras Med Trop*, 20(supl II): 77.



- Rassi, A., Rassi Jr. A., Rassi, G.G.** (2000). Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., p. 231.
- Reunião de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas**, (1985). Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 18: 46.
- Rezende, J.M.** (1956). de Megaesôfago por doença de Chagas. *Rev Goiana Med*, 2: 297-314.
- Rezende, J.M., Moreira, H.** (2000). Forma digestiva da doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., p. 298.
- Reyes, M.B., Lorca M., Muñoz, P., Frasc, A.C.C.** (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 2846-2850.
- Rohwedder, W.R.** (1969). Infección Chagásica en donadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. *Bol Chil Parasitol*, 24: 88-93.
- Russomando, G., Figueredo, A., Almirón, M., Sakamoto, M., Morita, K.** (1992). Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol*, 30: 2861-2868.
- Russomando, G., Rojas-de-Arias, A., Almiron, M., Figueredo, A., Ferreira, M.E., Morita, K.** (1996). *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*, 83: 62-66.
- Russomando, G., Tomassone, M.M., Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almirón, M., Candia, N., Calcena, M.F., Figueredo A.** (1998). Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the polymerase Chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 487-491.
- Schmunis, G.A.** (1985). Chagas disease and blood transfusion. In: Dodd, R.V., Barker, L.F. (eds.) *Infect Immun Blood Trans*. New York: AR Liss, pp. 127-145.

- Schmunis, G.A.** (1991). *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and no endemic countries. *Transfusion*, 31: 547-557.
- Silva, R.A., Carvalho, M.E., Rodrigues, V.L.C.C.** (2001). *Doença de Chagas – Profissionais da Saúde*, pp. 1-5. DOT/SUCEN, São Paulo.
- Silveira, J.F.** (1992). Serological diagnosis – *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: Wendel S, Brener Z, Camargo m, Rassi A (ed). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, pp. 207-218.
- Silveira, A.C., Feitosa, V.R., Borges, R.** (1984). Distribuição de triatomíneos domiciliados no período 1975/1983 no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*, 36: 15-312.
- Silveira, A.C., Vinhaes, M.C.** (1998). Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop*, 31:15-60.
- Silveira, A.C., Vinhaes, M.C.** (1999). Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. I): 405-411.
- Smith, B., Morson, B.C.** (1972). *The neuropathology of the alimentary tract*. London: Edward Arnold.
- Stolf, A.M.S.** (1992). Serological diagnosis – *Trypanosoma cruzi* antigens in serodiagnosis. In: Wendel S., Brener Z., Camargo ME., Rassi A. (ed). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, pp. 195-205.
- Storino, R.** (1994). Barragán, H. Epidemiología. In: Storino R., Milei J. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Mosby Ed., pp. 51-74.
- Sturm, N.R., Degrave, W., Morel, C., Simpson, L.** (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of

kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol*, 33: 205-214.

**TDR**, (2001). *TDR XV Programme Report, Progress 1999-2000*. Home page at <http://www.who.int/tdr/research/progress9900/partnership/chagas.htm>

**Umezawa, E.S., Shikanai-Yasuda, M.A., Gruber, A., Pereira-Chiocola, V.L., Zingales, B.** (1996). *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catole do Rocha, Paraíba). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(1): 87-93.

**Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Camargo, M.E., Yamauchi, L.M., Santos, M.R., Gonzalez, A., Zingales, B., Levin, M.J., Sousa, O., Rangel-Aldao, R., da Silveira, J.F.** (1999). Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas` disease in South and Central America. *J Clin Microbiol*, 37(5): 1554-1560.

**Umezawa E.S., Silveira, J.F.** (1999). Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 285-288.

**United Nations**, (1992). *World urbanization prospects*. New York: UN, 79-10.

**Valente, S.A.S., Valente, V.C., César M.J.B., Santos, M.P.** (1997). Registro de 15 casos autóctones de doença de Chagas no Estado do Amapá com evidência de transmissão oral. *XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Belo Horizonte). Resumo de Temas Livres, p. 53.

**Veas, F., Brenière, S.F., Cuny, G., Brengues, C., Solari, A., Tibayrene, M.** (1991). General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol*, 37: 73-84.

**Vergara, U., Veloso, C., Gonzalez, A., Lorca, M.** (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas` disease using synthetic peptides. *Am J Trop Med Hyg*, 46(1): 39-43.

- Vickerman, K., Preston, T.M.** (1976). Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden W.H.R., Evans D.A. (eds). *Biology of Kinetoplastida*, vol I. London: Academic Press, pp. 66-102.
- Vinhaes, M.C., Dias, J.C.P.** (2000). Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saude Publica*, 16(2): 1-10.
- Wendel, S., Pinto Dias J.C.** (1992). Transfusion transmitted Chagas disease. In: Wendel, S., Brener Z, Camargo M.E., Rassi A. (eds.) *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*, pp. 103-133.
- WHO**, (1991). Technical Report Series. *Control of Chagas Disease*. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization.
- WHO** (2002). Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *Tech Rep Ser* 905, 109 pp.
- Wincker, P., Brito, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., Morel, C.M.** (1994). Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in rural endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*, 51: 771-777.
- Zeledón, R.** (1974). Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas disease. Geneva, Suíça. *Ciba Foundation Symposium*, 28: 51-77.
- Zingales, B. Gruber, A., Ramalho, C.B., Umezawa, E.S., Colli, W.** (1990). Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85(4): 519-522.
- Zuna, H., La Fuente, C., Valdez, E.** (1985). Estudio prospectivo de la transmisión del *Trypanosoma cruzi* por via sanguínea en Bolivia. *Ann Soc Belg Med Trop*, 65 (1): 107-113.

## 4. Manuscrito

*Avaliação de um Teste ELISA Recombinante para  
Diagnóstico da Doença de Chagas em um Banco de  
Sangue*

A ser submetido à revista

**Mem Inst Oswaldo Cruz**  
Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

***Avaliação de um Teste ELISA Recombinante para Diagnóstico da Doença de Chagas em um Banco de Sangue***

**Wandeje M. Barros da Rocha<sup>1,\*</sup> e Paulo P. Andrade<sup>2</sup>**

**1.** Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Hemope. Rua. Joaquim Nabuco, 171, Graças, 52011-000, Recife – PE, Brazil. **2.** Departamento de Genética/CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego s/n, 50670-901, RECIFE, PE, Brasil.

\* autor correspondente

**Palavras-chave:** doença de Chagas, antígeno recombinante, banco de sangue, sorologia.

## Resumo

O uso de antígenos recombinantes pode contribuir para aumentar a sensibilidade e a especificidade do ensaio, além de reduzir custos. Comparamos os resultados obtidos com as três metodologias usadas na Fundação Hemope: a HAI e o ELISA, empregados na triagem, e a IFI, empregada como teste confirmatório com o ELISA recombinante *in-house* preparado com o antígeno DH-1D. A comparação foi realizada com 298 soros (positivos, indeterminados ou negativos) obtidos dos doadores após a realização do teste confirmatório. O rec ELISA quando comparado com o conjunto diagnóstico da Organon, apresentou uma sensibilidade ligeiramente maior de 97% enquanto no outro a sensibilidade foi de 95%. Quando foi comparado com o conjunto diagnóstico da Gull, apresentou uma sensibilidade bem menor de 88% enquanto no outro a sensibilidade foi de 95%. Como nesse estudo, o ELISA rec não apresentou resultados muito superiores aos conjuntos diagnósticos comerciais, que possuem resultados muito discordantes entre si, continuaremos aprimorando o nosso antígeno recombinante isoladamente ou utilizando juntamente com outros que já possuímos. Os dados da HAI não foram utilizados porque apresentaram resultados muito discordantes. E com relação a IFI, podemos dizer que apesar da sensibilidade e especificidade elevadas, na prática, esse teste não é adequado para ser usado como confirmatório e conseqüentemente não pode ser considerado o teste gold standard.

## Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América Latina e afeta 16 a 18 milhões de pessoas, com aproximadamente 100 milhões de pessoas vivendo em área de risco e com cerca de 50.000 pacientes chagásicos morrendo a cada ano. No Brasil, a endemia é encontrada em 17 estados das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-oeste, mas os bem sucedidos programas de controle do inseto vetor, com a Iniciativa do Cone Sul, aboliram quase completamente a transmissão vetorial (Moncayo 1999, Silveira & Vinhaes 1999; WHO 2002). Desta forma, a transfusão sangüínea passou a ser o principal modo de infecção, com 20.000 novos casos estimados por ano para as cinco ou seis milhões de transfusões anuais realizadas no início da década de 90 (Dias 1992). É possível que a doença de Chagas se torne um problema mundial de saúde pública, já que existe também a migração de portadores da América Latina para os países desenvolvidos (Schmunis 1991, Kirchhoff 1993, Crovato & Reborá 1997). No Brasil a soroprevalência da doença entre doadores de sangue é cerca de 0,7%, podendo atingir 5% no estado de Goiás (Wendel & Gonzaga 1993, Dias & Schofield 1998). Portanto, é muito importante que a triagem sorológica seja o mais eficiente possível, para poder identificar e descartar todo o sangue contaminado sem prejudicar o suprimento de sangue do país (Oelemann et al. 1998).

Os métodos tradicionais de detecção do parasita, como a hemocultura e o xenodiagnóstico, são demorados e de baixa sensibilidade; a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) é mais sensível, mas não pode ser empregada na rotina de bancos de sangue devido aos sérios problemas observados de contaminação de material e amostras por amplicons de reações positivas anteriores. Sendo assim, a técnica usualmente empregada no diagnóstico da infecção crônica ou indeterminada é a detecção sorológica



dos anticorpos dirigidos contra o parasita (Wincker et al. 1994, Britto et al. 1995). Os testes diagnósticos comercialmente disponíveis são baseados no uso de extratos totais ou frações semipurificadas das formas epimastigotas, com consideráveis variações na reprodutibilidade e na confiabilidade dos resultados obtidos com diferentes métodos (Camargo et al. 1986). Foram observadas reações cruzadas principalmente em pacientes com leishmaniose ou com infecção por *Trypanosoma rangeli* (Guhl et al. 1987). Adicionalmente, alguns pacientes chagásicos podem apresentar resultados negativos na sorologia clássica (Luquetti 1987).

Antígenos recombinantes vêm sendo isolados e avaliados na última década quanto ao seu potencial para melhorar os resultados da sorologia para a doença de Chagas (Cetron et al. 1992, Gruber & Zingales 1993, Guevara et al. 1999, Umezawa & Silveira 1999, Houghton et al. 2000, Iwai et al. 2001, Nakazawa et al. 2001). O estudo que primeiro avaliou e permitiu a classificação diagnóstica desses antígenos foi empreendido pela Organização Mundial de Saúde, sendo testados 17 ARs com um número limitado de soros e com os imunoenaios desenvolvidos por cada laboratório participante (Moncayo & Luquetti 1990). Vários outros estudos se seguiram, avaliando conjuntos de antígenos de diferentes laboratórios, antígenos de uma mesma procedência ou ainda peptídeos sintéticos (Levin et al. 1991, Godsel et al. 1995, Krautz et al. 1998, Umezawa et al. 1999, Ferreira et al. 2001, Gomes et al. 2001, Brenière et al. 2002, Matsumoto et al. 2002). Vários ARs e peptídeos mostraram-se promissores para o desenvolvimento de novos testes comerciais, mas apenas o conjunto CRA/FRA está pronto para ser introduzido na rotina laboratorial (Krieger et al., 1992; Gomes et al., 2001)

Nos Bancos de Sangue do Brasil, é obrigatória a realização de pelo menos dois testes sorológicos, para a doença de Chagas, baseados em metodologias diferentes.

Atualmente são usados com mais frequência a imunofluorescência indireta (IFI), a hemaglutinação indireta (HAI) e o ELISA (Leiby et al. 2000). Dentre esses, na triagem sorológica dos doadores, o principal teste normalmente é o ELISA, já que a HAI leva freqüentemente a resultados falso-positivos ou falso-negativos devido à interpretação subjetiva. A escolha do ELISA se dá devido a sua capacidade de ser automatizado, permitindo a quantificação de um grande número de amostras ao mesmo tempo e num curto período; Adicionalmente os resultados obtidos são mais acurados porque tanto a leitura objetiva quanto os critérios de validação e a interpretação dos resultados são mais rigorosos (Ferreira et al. 1991, Oelemann et al. 1998). Os doadores que dão resultados positivos ou indeterminados (reagente em apenas um teste) nessa triagem, são chamados para uma nova coleta, onde além de se fazer a repetição dos testes iniciais é realizado um terceiro teste, que tem papel confirmatório, que no caso da Fundação Hemope é a IFI.

Em nosso trabalho, utilizamos um teste ELISA in-house, que emprega a proteína recombinante DH-1D, isolada e estudada previamente por Santos (1996), e comparamos os resultados com aqueles obtidos pelas metodologias utilizadas na Fundação Hemope - Hemocentro Pernambuco.

## Material e Métodos

**População estudada:** amostras de soros de 298 doadores (positivos, indeterminados ou negativos) de sangue da Fundação Hemope (Pernambuco, Brasil), residentes tanto no Recife e região Metropolitana (96) quanto no interior do Estado (184), além de 18 cujos domicílios não foram localizados. Esses doadores voltaram ao serviço para fazer uma nova coleta para confirmação ou não dos resultados obtidos na Triagem Sorológica, usando os mesmos testes iniciais (HAI e ELISA) e, foi realizada então uma IFI com a amostra colhida nesta ocasião, como teste confirmatório.

**HAI:** foram usados dois conjuntos diagnósticos comercialmente disponíveis. O Hemacruzi (antígenos totais solúveis do *T. cruzi*) da Biolab Diagnóstica S.A. (Biolab-Mérieux) ou o Imuno HAI (antígenos altamente purificados do *T. cruzi*) da WAMA diagnóstica (Brasil), ambos usando o 2-ME. As amostras foram consideradas reagentes quando possuíam um título  $\geq 1/40$  no Hemacruzi e  $\geq 1/32$  na WAMA. Os ensaios foram lidos e interpretados visualmente.

**ELISA:** foram usados três conjuntos diagnósticos comercialmente disponíveis. O Hemobio Chagas da Embrabio – Empresa Brasileira de Biotecnologia S.A., o Chagatek da Organon Teknika Argentina (Biolab-Mérieux) e o Chagas' IgG ELISA test da Gull Laboratories, Inc. (USA), todos produzidos com antígenos purificados. O ponto de corte da Embrabio é a média dos controles negativos mais D.O. 0,300; o do Chagatek é a média dos controles negativos mais D.O. 0,100; e o da Gull é a média dos soros referências, todos esses confrontos de diagnóstico possuem uma região boderline de mais ou menos 20%. Esses ensaios foram lidos em leitoras automáticas, com filtros de 450/630nm, 450nm e 405nm, respectivamente.

**IFI:** foi usado um conjunto diagnóstico comercialmente disponível da Biolab Diagnostica S.A. (Brasil) que utiliza formas epimastigotas e IgG anti-humana conjugada com fluoresceína. As amostras foram consideradas reagentes quando possuíam um título  $\geq 1/20$ . Os ensaios foram lidos e interpretados visualmente.

**Antígeno Recombinante:** foi empregado neste ensaio, o clone DH-1D, previamente identificado por Santos (1996). Ele codifica a fração carboxi-terminal de uma proteína de *T. cruzi*, com P.M. 30 kDa. O clone, estocado em laboratório na forma de fago ( $\lambda$ ZAPII, Stratagene, USA), foi convertido para a forma plasmidial por excisão in vivo na bactéria *E. coli* XL1-Blue, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o plasmídeo foi extraído e empregado para transformar a linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Os sonicados das culturas primárias desta nova linhagem, feitas na presença de IPTG e ampicilina, foram centrifugados a 6.000g por 30 minutos e os sobrenadantes avaliados, após separação por eletroforese em poli-acrilamida, imunoblot e revelação com soro de paciente com doença de Chagas, quanto à concentração de DH-1D. Sonicados ricos em proteína recombinantes foram agrupados num único tubo e estocados a -20°C até o uso.

**ELISA in-house:** Um rec ELISA que foi realizado essencialmente como descrito pela padronização de Santos, 1996. Existem outros estudos que demonstram o uso de proteínas recombinantes em testes sorológicos, principalmente no ELISA (Zingales et al. 1990, Almeida et al. 1990, Umezawa et al. 1996, Passos et al. 1997, Umezawa & Silveira 1999, Gomes et al. 2001, Brenière et al. 2002). As placas foram previamente cobertas com poli-lisina e em seguida sensibilizadas com 50 $\mu$ l da proteína recombinante, em cada poço, com uma concentração de 8 $\mu$ g/poço, por 12h, a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas, neutralizadas com uma solução de leite desnatado a 2% em salina tamponada, lavadas outra vez e estocadas a -20°C até o momento do uso. Os soros foram inicialmente diluídos 1/50,

em salina tamponada + 0,05% Tween20 (solução de lavagem), adicionada de 2% de leite desnatado e sonicado de *E. coli* DH5 $\alpha$  não transformada, em uma concentração final de 100 $\mu$ g/ml, e deixados imunoadsorver contra os antígenos de *E. coli* por 12h a 4°C. Em seguida foi feita uma diluição seriada, de 1/50 até 1/400, dispensando-se em cada poço uma quantidade final de 50 $\mu$ l, e incubando-se por 1 hora a 37°C; após 4 lavagens, foram acrescentados 50 $\mu$ l do conjugado em cada poço (uma solução de anticorpos de cabra anti-IgG humana ligados à peroxidase – SIGMA) diluído a 1/3000 em solução salina tamponada, incubando-se novamente a placa por 1 hora a 37°C; após 4 novas lavagens, 50 $\mu$ l da solução substrato foram acrescentados a cada poço (tampão citrato + peróxido de hidrogênio + ortofenilenodiamina) e a placa novamente incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro; a reação foi então bloqueada com ácido sulfúrico 1N e a leitura feita em fotocolorímetro multicanal com filtros de 492/620nm. O ponto de corte escolhido para o ELISA *in-house* foi a média dos três controles negativos da diluição 1/100 de cada placa mais 1 SD com uma região borderline +/- 20%.

**Análise dos dados:** os resultados das amostras, na diluição 1/100, registrados em D.O. , foram empregados na construção de um gráfico de dispersão, calculando-se d (distância relativa) = (D.O. leitura/D.O. ponto de corte) - 1. Todos os resultados foram agrupados em tabelas, que podem ser acessadas pelo endereço <http://www.tcruci.hpg.com.br>.

## Resultados

Devido à falta de um “Gold Standard” no diagnóstico da doença de Chagas crônica e indeterminada, procuramos neste trabalho comparar os resultados dos dois testes comerciais (ELISA Organon e Gull) com o ELISA rec, empregando o painel de 298 soros obtidos dos doadores após os testes confirmatórios, que tiveram um resultado sorológico considerado positivo (reagente em todos os testes), indeterminado (reagente em apenas um ou dois testes) ou negativo (não reagente nos três testes). Esses resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Dentre as 99 amostras triadas pelo conjunto diagnóstico da Organon e de acordo com os seus critérios de validação, 5 amostras foram consideradas não reagentes, 14 indeterminadas e 80 reagentes. O ELISA rec apresentou, para o mesmo painel de soros, 3 amostras não reagentes, 11 indeterminadas e 85 reagentes. Todos os 5 soros não reagentes no conjunto Organon apresentaram resultados reagentes no ELISA rec: dois eram não reagentes na HAI, um era não reagente para HAI e IFI, um era reagente para HAI e IFI e um soro reagente apenas na HAI. Os 14 soros classificados como indeterminados pelo conjunto Organon tiveram 11 resultados reagentes e 2 indeterminados pelo ELISA rec, com exceção de um, que deu resultado não reagente e que tinha também resultados não reagentes na HAI e na IFI. Em relação aos 80 soros reagentes no conjunto Organon: 69 foram consideradas reagentes, 9 foram indeterminados e 2 não reagentes pelo ELISA rec (eles tinham também resultados não reagentes pela HAI, porém eram reagentes pela IFI). Estes resultados apontam para uma sensibilidade ligeiramente maior do ELISA rec (97%), quando comparado ao conjunto Organon (95%), se levarmos em conta que a maior parte dos soros do painel era, de fato, positiva.

Apenas uma amostra foi testada com o conjunto diagnóstico da Embrabio (D.O. = 3.000 e Cut-off = 0.308, incluída aqui entre os resultados do conjunto Organon) e deu resultados reagentes tanto para a Embrabio quanto para o ELISA rec.

Dentre as 199 amostras triadas pelo conjunto diagnóstico da Gull e de acordo com os seus critérios de validação, 10 amostras foram consideradas não reagentes, 59 indeterminadas e 130 reagentes. O ELISA rec, de acordo com os nossos critérios, apresentou 24 amostras não reagentes, 30 indeterminadas e 145 reagentes. Nove resultados não reagentes no conjunto da Gull apresentaram resultados reagentes no ELISA rec (5 foram não reagentes na HAI, um foi HAI e IFI reagente, dois foram HAI reagentes e um IFI reagente), com exceção de um, que também foi não reagente para a HAI. Os 59 soros classificados como indeterminados pelo conjunto da Gull tiveram 42 resultados reagentes e 7 indeterminados pelo ELISA rec, com exceção de 10, que deram resultados não reagentes no ELISA rec (um tinha também resultados não reagentes na HAI e na IFI, 7 tinham apenas a IFI reagentes, 2 tinham HAI e IFI reagentes). Em relação aos 130 reagentes da Gull, 94 foram consideradas reagentes, 23 foram indeterminados e 13 não reagentes pelo ELISA rec (um tinha resultado reagente apenas pela IFI, e 12 tinham resultados reagentes pela HAI e IFI). Estes resultados apontam, neste caso, para uma menor sensibilidade do ELISA rec (88%), quando comparado ao conjunto Gull (95%), com um nível menor de concordância entre os dois testes do que quando o ELISA rec foi comparado ao conjunto da Organon.

Os resultados da avaliação individual de cada amostra pelos conjuntos diagnósticos para a metodologia ELISA (Embrabio, Organon Teknika e Gull), HAI (Biolab e Wama) e IFI (Biolab) estão sumarizados nas tabelas contidas na planilha denominada *Chagas disease sera databank*, na página <http://www.tcruzi.hpg.br>.

A divergência entre três dos testes empregados neste trabalho (ELISA Organon, ELISA Gull e o ELISA rec) foi analisada através de um gráfico de dispersão da intensidade de reação  $d = (D.O. \text{ leitura}/D.O. \text{ ponto de corte}) - 1$ , de cada soro, para cada par de testes analisados. Este estudo teve por fim avaliar de forma detalhada a concordância entre os testes. Para dois ensaios quantitativos espera-se uma reta ascendente como resultado da regressão linear dos pares de pontos ( $d_1, d_2$ ).

A Figura 1 mostra a dispersão dos resultados para os testes ELISA rec e ELISA Organon, obtida tomando-se um desvio padrão para a definição do ponto de corte do ELISA rec. As distâncias são maiores ao eixo das abscissas do que ao das ordenadas, indicando que o ELISA Organon produz uma reação positiva mais intensa do que o ELISA recombinante. Por outro lado, os testes negativos no ELISA recombinante mostraram em seu conjunto pequena distância ao eixo das abscissas, enquanto os resultados negativos no teste ELISA Organon em geral tiveram um distanciamento maior do eixo das ordenadas, o que mostra que o teste ELISA Organon tem uma reação de fundo menos intensa do que o sistema ELISA recombinante. Não foi observada coerência entre valores absolutos de reação entre os testes, não sendo possível ajustar uma reta ascendente na matriz de distância obtida.

A Figura 2 mostra a dispersão dos resultados para os testes ELISA rec e ELISA Gull. As distâncias são maiores ao eixo das ordenadas do que ao das abscissas (4 vezes maior, em média), indicando que o ELISA recombinante produz uma reação positiva muito mais intensa do que o conjunto Gull. Por outro lado, os testes negativos no ELISA recombinante mostraram em seu conjunto pequena distância ao eixo das abscissas, enquanto os resultados negativos no teste ELISA Gull em geral tiveram muito maior distanciamento do eixo das ordenadas, o que mostra que o teste ELISA Gull tem uma



reação de fundo quase nula, quando comparada ao sistema ELISA recombinante. Mais uma vez, não foi observada coerência entre valores absolutos de reação entre os testes, não sendo possível ajustar uma reta ascendente na matriz de distância obtida.

Em seguida, foi analisada também a divergência entre os três testes empregados neste trabalho (ELISA Organon, ELISA Gull e o ELISA rec) em relação a IFI através de um gráfico de dispersão da intensidade. Embora dispersos, os pares de distância mostram coerência entre os ensaios ELISA Organon e IFI, ELISA Gull e IFI e o ELISA rec e IFI (Figuras 3, 4 e 5), com uma clara tendência a aumento de distância proporcional ao aumento dos títulos em IFI. Os testes ELISA Gull e o ELISA rec, contudo, apresentaram um grande número de falso-negativos (Figuras 4 e 5), quando comparados ao teste ELISA Organon (Figura 3).

## Discussão

Os resultados da comparação entre os testes ELISA rec e ELISA Organon mostram que o ensaio recombinante é ligeiramente mais sensível do que o ensaio empregando antígenos purificados de *Trypanosoma cruzi*. Este resultado, que não coincide com o observado na comparação entre o ELISA rec e o ELISA Gull, não era esperado, pois se admite que a pequena quantidade de diferentes epitopos disponíveis nos antígenos recombinantes predisporia ensaios baseados nestes antígenos a uma perda de sensibilidade em relação a ensaios baseados em antígenos complexos (Luquetti & Rassi, 2000). Entretanto, outros antígenos recombinantes mostraram-se úteis no desenvolvimento de ensaios muito sensíveis (Levin et al 1991, Peralta et al. 1994, Godsel et al 1995, Oelemann et al 1998, Gomes et al 2001), com seqüências de aminoácidos repetidas ou não. A introdução de multipetídeos (Ferreira et al. 2001) ou de peptídeos sintéticos com múltiplos epitopos (Houghton et al., 2000) tem sido uma forma de aumentar a disponibilidade de epitopos, sem perder a especificidade gerada pelo uso de antígenos definidos, mas os resultados obtidos são, até agora, equivalentes àqueles obtidos com o uso de um único ou de dois antígenos recombinantes. A elevada sensibilidade alcançada no presente ensaio, compatível com aquela descrita para outros antígenos definidos, indica que há com freqüência uma elevada quantidade de anticorpos contra um único epitopo, na doença de Chagas crônica. Este fenômeno foi descrito para os anticorpos produzidos contra HSP70 em diferentes doenças infecciosas (Andrade & Andrade, 1996).

Nossos resultados indicam que os testes ELISA Organon e ELISA Gull diferem entre si de forma notável, sendo o ELISA Gull bem mais sensível do que o ELISA rec e com menor correlação entre seus resultados e os obtidos por IFI. Várias podem ser as causas desta diferença entre dois ensaios que empregam antígenos purificados: a influência

do estágio de desenvolvimento do parasita (Camargo 1992, Oelemann et al. 1999, Ferreira & Moraes de Avila 2001), a forma de cultivo e o meio de cultura (Oelemann et al. 1998), os procedimentos de extração e a superfície de fixação (no caso de ensaios heterogêneos), que podem esconder ou expor epitopos que possuem afinidades diferentes para os anticorpos específicos ou inespecíficos presentes no soro (Schechter & Nogueira 1988). Estas variáveis levam a grandes dificuldades na produção industrial dos diferentes lotes com desempenho comparável (Ferreira et al. 2001). Adicionalmente, o desempenho fraco dos dois testes comerciais em nosso estudo pode ser devido às respostas imunes específicas dos indivíduos infectados, que variam de região a região do país. De fato, a sensibilidade e especificidade dos ensaios variam de acordo com a procedência dos soros (Carvalho et al. 1993), e as menores foram alcançadas para estes testes quando soros provenientes da região Nordeste foram testados (Oelemann et al 1998).

O teste de imunofluorescência indireta é geralmente considerado como o teste comprobatório, na ausência de um “Gold Standard” para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas (Ferreira & Moraes de Ávila 1995). Nossos resultados, contudo, mostram que, embora os títulos na IFI tendam a aumentar com a reatividade nos ELISA com antígeno complexo ou recombinante, há uma extensa gama de resultados conflitantes, com soros não reativos em IFI e reagentes nos demais testes, e vice versa. Assim, o teste de IFI não parece ser suficientemente acurado para ser empregado como teste confirmatório, pelo menos com o protocolo e os reagentes empregados neste estudo.

A alternativa encontrada pelos bancos de sangue para aumentar a sensibilidade da sorologia para doença de Chagas tem sido o emprego de dois ou mais testes sorodiagnósticos, alcançando-se, desta forma, uma sensibilidade próxima a 100%. Este procedimento, contudo, reduz a especificidade global, o que leva a uma porcentagem

significativa de doadores com sorologia indeterminada, implicando no descarte do sangue e na rejeição do doador. Este desperdício seria bastante reduzido, assim como preservado o conjunto de doadores, se houvesse a disponibilidade de um único teste sorodiagnóstico com elevada sensibilidade, nas várias áreas endêmicas do país (Gomes et al. 2001). Adicionalmente, os resultados falso-positivos criam problemas sociais para os doadores que forem erroneamente classificados como positivos (Krieger et al. 1992). O caminho para o desenvolvimento de um ensaio com estas características parece ser o uso de antígenos recombinantes. Esta é a tendência em bancos de sangue para as demais patologias, que, com exceção da sífilis, empregam antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos, ou uma mistura dos dois antígenos, ou ainda anticorpos monoclonais.

Nosso trabalho demonstra a utilidade de um novo antígeno de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* para a doença de Chagas e expõe a inconsistência entre os resultados obtidos com diferentes sistemas comerciais de sorodiagnóstico para a doença de Chagas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FACEPE (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco) pelo auxílio financeiro prestado. Pela ajuda com a concessão das amostras dos doadores de sangue à Fundação HEMOPE. E pela ajuda na execução do trabalho ao Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da UFPE.

## Referências

- Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S 1990. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(4): 519-522.
- Andrade PP, Andrade CR 1996. Heat shock proteins in Leishmaniasis. In: Stress proteins in medicine (Van-Willem E., Young DB. eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 307-325.
- Brenière SF, Bosseno MF, Noireau F, Yaesik N, Liegeard P, Aznar C, Hhontebeyrie M 2002. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(3): 289-295.
- Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincher P 1995. Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and evaluation. *Parasitology* 110: 241-247.
- Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Souza JMP, Carvalheiro JR, Yanovsky JF, Guimarães MCS 1986. Collaboration on the standardization of Chagas disease in the Americas: an appraisal. *PAHO Bul* 20: 233-244.
- Camargo ME 1992. An appraisal of Chagas disease serodiagnosis, pp. 165-178. In S Wendel, Z Brener, ME Camargo & A Rassi (eds). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brasil 92. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, Brasil.
- Carvalho MR, Krieger MA, Almeida EC, Oelemann W, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Borges-Pereira J, Sáez-Alquézar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF, Goldenberg S 1993. Chagas disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33: 830-834.
- Cetron MS, Hoff R, Kahn S, Eisen H, Van Voorhis WC 1992. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas` disease. *Acta Trop* 50(3): 259-266.
- Crovato F, Reborá A 1997. Chagas disease a potential plague for Europe? *Dermatology* 195(2): 184-185.

- Dias JCP 1992. Epidemiology of Chagas disease, pp. 49-80. In S Wendel, Z Brener, ME Camargo & A Rassi (eds). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, ISBT, São Paulo.
- Dias JCP, Schofield CJ 1998. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 373-383.
- Ferreira AW, Belem ZR, Moura MEG, Camargo ME 1991. Aspectos da padronização de testes sorológicos para doença de Chagas: um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 123-128.
- Ferreira AW, Moraes de Avila SL 1995. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. *São Paulo Med J/RPM* 113: 767-771.
- Ferreira AW, Moraes de Avila SL (eds) 2001. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, 2nd ed., pp. 241-249. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil.
- Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol* 39(12): 4390-4395.
- Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CL, Chaudoir BM, Engman DM 1995. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 33(8): 2082-2085.
- Gomes YM, Pereira VRA, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MNDS, Ferreira AGP, Silva ED, Ogatta SFY, Krieger MA, Goldenberg S 2001. Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(4): 497-501.
- Gruber A, Zingales B 1993. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 76(1): 1-12.
- Guevara AG, Ruiz JC, Houghton RL, Reynolds L, Sleath P, Benson D, Ouaisi A, Guderian RH 1999. Evaluation of a recombinant protein (rT<sub>C</sub>24) and synthetic

- peptides in anti-*Trypanosoma cruzi* positive samples from blood bank donors in chagasic endemic areas of Ecuador. *J Trop Med Hyg*, vol. 27(1), pp. 19-22.
- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas disease. *Parasitology* 94: 475-484.
- Houghton RL, Benson DR, Reynolds L, McNeill P, Sleath P, Lodes M, Skeiky YAW, Badaro R, Krettli AU, Reed SG, 2000. Multiepitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Patients with Treated or Untreated Chagas' disease. *J Infect Dis* 181: 325-330.
- Iwai LK, Duranti MA, Abel LC, Juliano MA, Kalil J, Juliano L, Cunha-Neto E 2001. Retro-inverso peptide analogues of *Trypanosoma cruzi* B13 protein epitopes fail to be recognized by human sera and peripheral blood mononuclear cells. *Peptides* 22(6): 853-860.
- Krautz GM, Peterson JD, Godsel LM, Krettli AU, Engmann DM 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am J Trop Med Hyg* 58(2): 137-143.
- Kirchhoff LV 1993. American Trypanosomiasis (Chagas disease) - a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* 329: 639-644.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S 1992. Use of recombinant for the accurate immunodiagnosis of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427-434.
- Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA 2000. Serologic Testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of Radiomunoprecipitation Assay With Commercially Available Indirect Immunofluorescence Assay, Indirect Hemagglutination Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits. *J Clin Microbiol* 38(2): 639-642.
- Levin MJ, Franco da Silveira J, Frasch AC, Camargo ME, Lafon S, Degraeve W, Rangel Aldao R 1991. Recombinant antigens and Chagas disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 89: 11-20.
- Luquetti AO 1987. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev. Goiana Med.* 33: 1-16.



- Luquetti AO, Rassi A 2000. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ed., pp. 360-361.
- Matsumoto TK, Cotrim PC, da Silveira JF, Stolf AM, Umezawa ES 2002. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42(3): 187-192.
- Moncayo, A. 1999. Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. *Medicina (B Aires)* 59 (Suppl 2): 120-124.
- Moncayo A, Luquetti AO 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 489-495.
- Nakazawa M, Rosa DAS, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MNDS, Abath FGC, Gomes YM 2001. Escretory-Secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of Chronic Chagas` Disease. *Am Soc for Microbiol* pp. 1024-1027.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Veríssimo da Costa GC 1998. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunoadsorbant assays for diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol* 36: 2423-2427.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Peralta JM 1999. Screening and confirmation in Chagas disease serology-a contribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 307-308.
- Passos VM, Volpini AC, Braga EM, Lacerda PA, Ouaiissi A, Lima-Martins MV, Krettli AU 1997. Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(6): 791-793.
- Peralta JM, Teixeira MDGM, Shreffler WG, Pereira JB, Burns Jr. JM, Sleath PR, Reed SG 1994. Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 32: 971-974.
- Santos ESC 1996. Polipeptídeo recombinante vacuolar de 29 kDa para diagnóstico da doença de Chagas. *Tese de Mestrado* 99 pp.

- Schechter M, Nogueira N 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol Biochem Parasitol* 29: 37-46.
- Schmunis GA 1991. *Trypanosoma cruzi* the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31: 547-557.
- Silveira AC, Vinhaes MC 1999. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 405-411.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Gruber A, Pereira-Chiocola VL, Zingales B 1996. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catole do rocha, Paraíba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(1): 87-93.
- Umezawa ES, Silveira JF 1999. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 285-288.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzáles A, Zingales B, Levin MJ, Souza O, Ángel-Aldao R, Silveira JF 1999. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South And Central America. *J Clin Microbiol* 37: 1554-1560.
- Wendel S, Gonzaga AI 1993. Chagas disease and blood transfusion: a new World problem? *Vox Sang* 64: 1-12.
- WHO 2002. Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *Tech Rep Ser* 905, 109 pp.
- Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51: 771-777.
- Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Colli W 1990. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(4): 519-522.

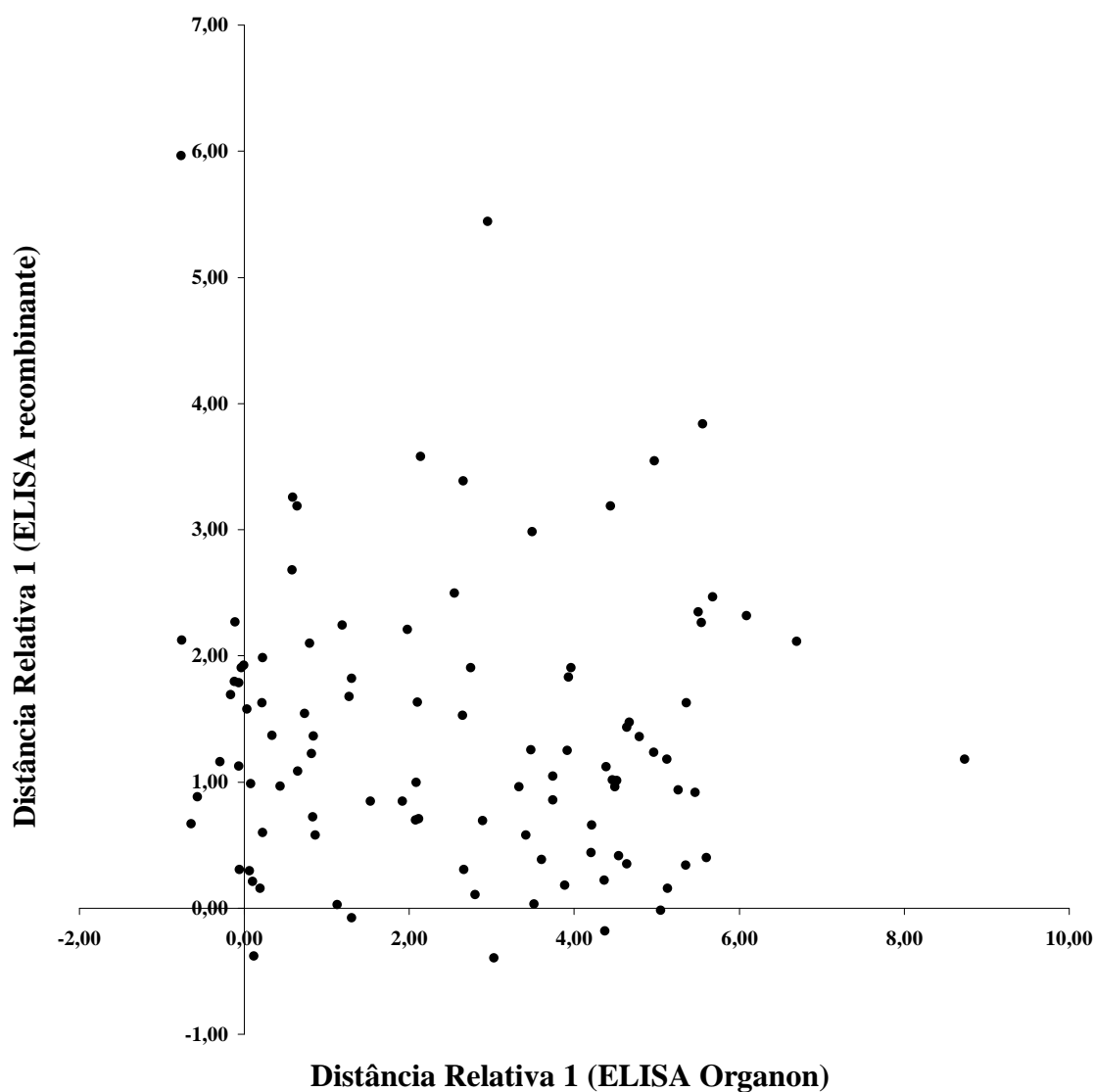


Figura 1. Comparação entre o conjunto diagnóstico da Organon e o ELISA rec, através das distâncias relativas.

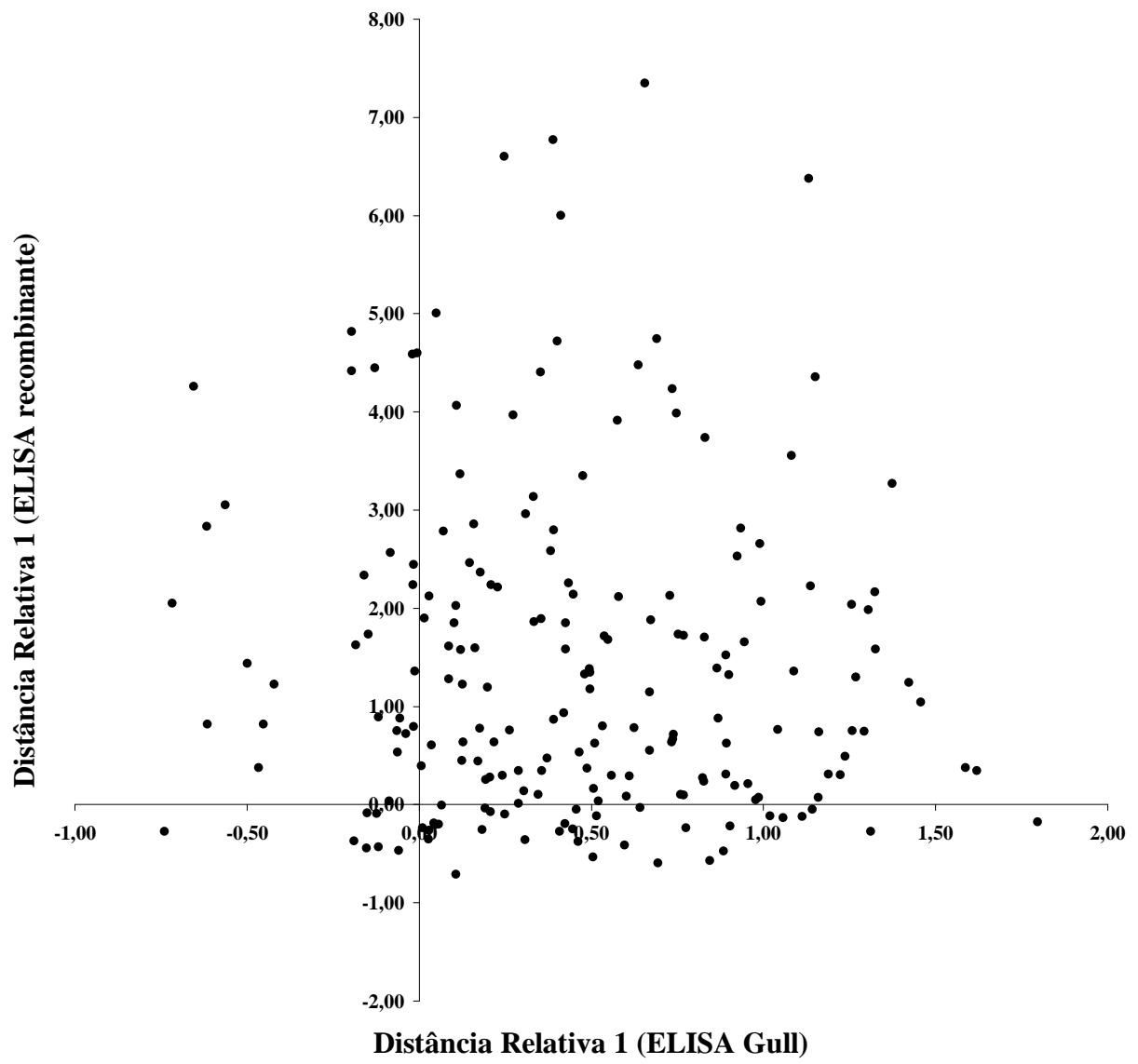


Figura 2. Comparação entre o conjunto diagnóstico da Gull e o ELISA rec, através das distâncias relativas.

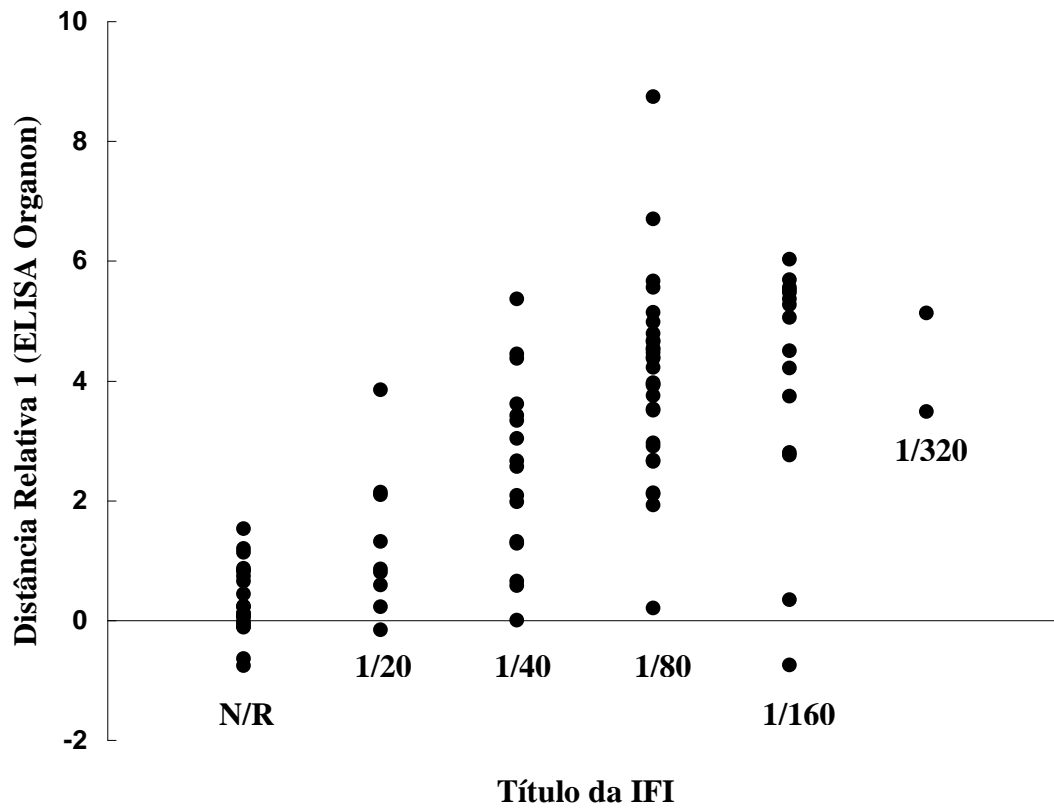


Figura 3. Comparação entre o conjunto diagnóstico da Organon e a IFI, através da distância relativa.

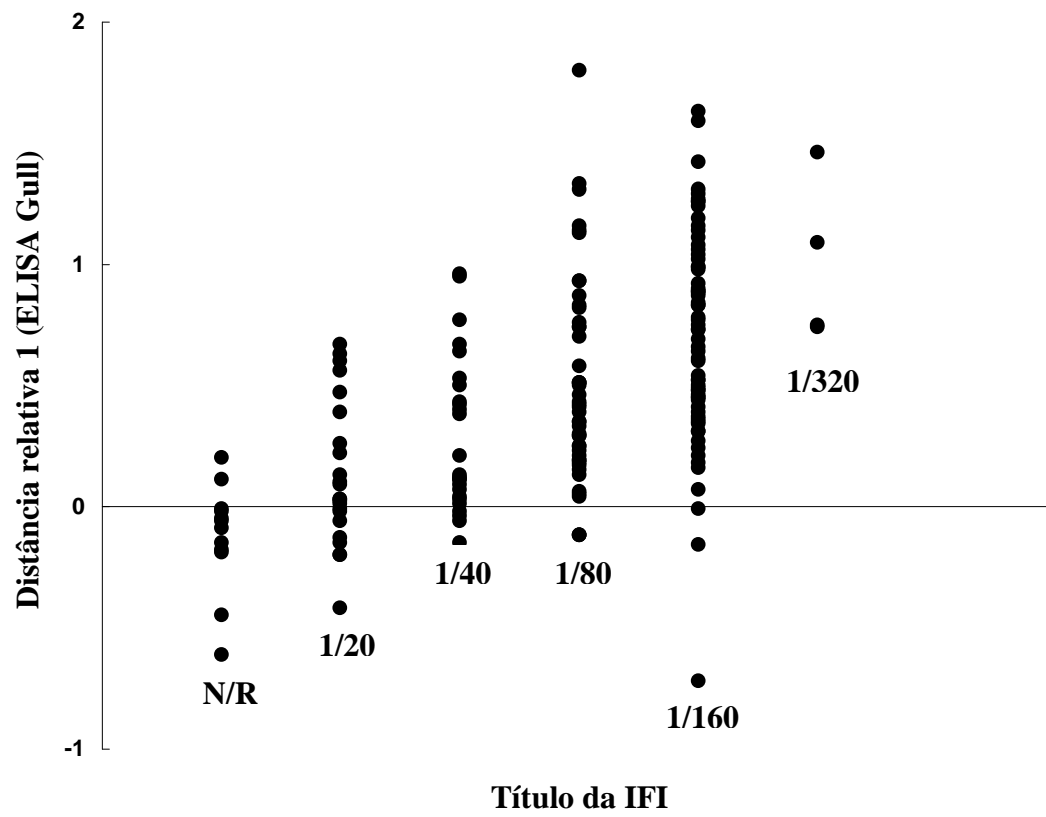


Figura 4. Comparação entre o conjunto diagnóstico da Gull e a IFI, através da distância relativa.

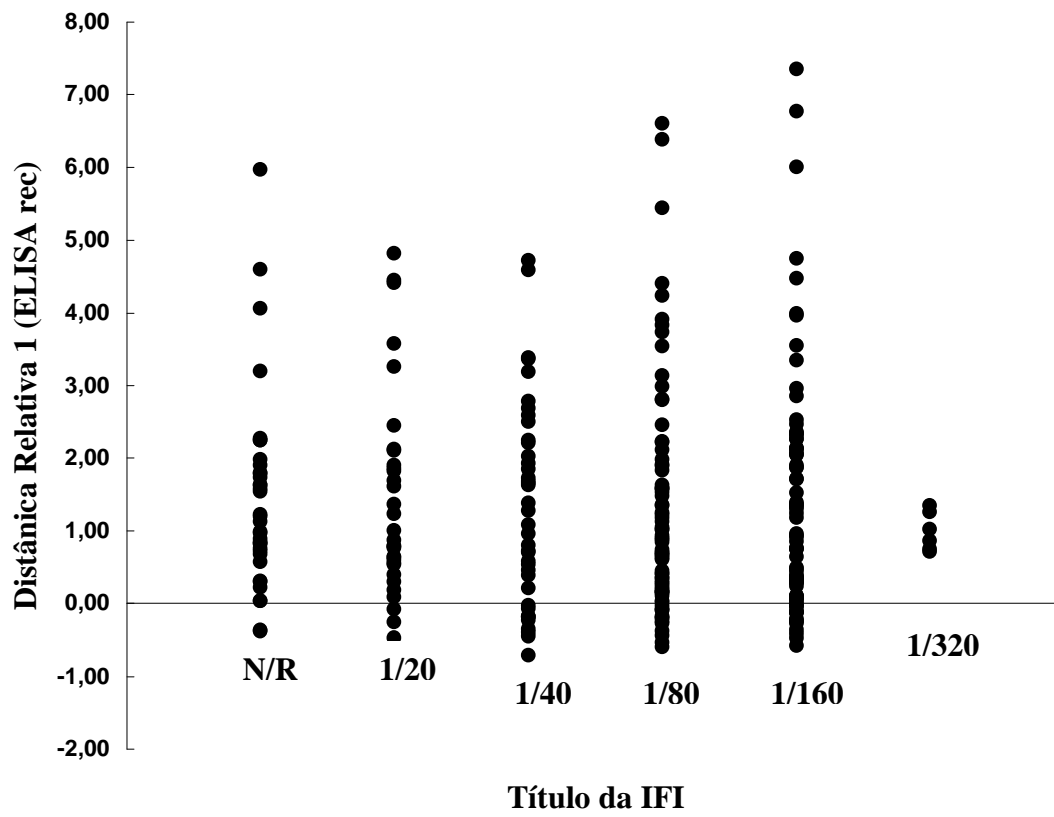


Figura 5. Comparação entre o conjunto diagnóstico ELISA rec e a IFI, através da distância relativa.

Tabela 1. Comparação dos resultados reagentes, indeterminados e não reagentes dos conjuntos diagnósticos comerciais com o ELISA rec.

Nº de amostras de soros						
ELISA Rec	Resultados do kit ELISA da Organon Teknika			Resultados do kit ELISA do Gull Laboratories		
	Reagente	Indeterminado	Não Reagente	Reagente	Indeterminado	Não Reagente
Reagente	69	11	5	94	42	9
Indeterminado	9	2	0	23	7	0
Não Reagente	2	1	0	13	10	1



## **5. APÊNDICE**

**Instrução para autores.**

***Revista Mem Inst Oswaldo Cruz***