

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária

Diagnóstico da infecção chagásica: aplicação e
avaliação de métodos sorológicos e da reação em
cadeia da polimerase em amostras clínicas de
pacientes chagásicos crônicos

Maria da Glória Martins Teixeira

Tese apresentada com vistas à obtenção do
título de Doutor em Ciências na área de
Imunologia

Orientadores: Prof. José Mauro Peralta
Prof. Walter M. R. Oelemann

Maio de 2000

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária

Diagnóstico da infecção chagásica: aplicação e
avaliação de métodos sorológicos e da reação em
cadeia da polimerase em amostras clínicas de
pacientes chagásicos crônicos

Maria da Glória Martins Teixeira

Tese apresentada em 02 de maio de 2000.

Banca examinadora:

Prof. Alejandro Luquetti Ostermayer
Prof. Adelaide José Vaz
Prof. Alberto Felix da Nóbrega
Dra. Tânia Araújo Jorge
Dra. Raquel da Silva Pacheco

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

T266 Teixeira, Maria da Glória Martins

Diagnóstico da infecção chagásica: aplicação e avaliação de métodos sorológicos e da reação em cadeia da polimerase em amostras clínicas de pacientes chagásicos crônicos / Maria da Glória Martins Teixeira. – Rio de Janeiro, 2000.
xv, 110 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2000.

Bibliografia: f. 85-109

1. Doença de Chagas. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. Ensaio imunoenzimático. 4. PCR. I. Título.

CDD 616.9363

Trabalho realizado no Laboratório de Sorologia de Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Agradecimentos

Nesta oportunidade, desejamos expressar o nosso agradecimento às pessoas e instituições que, contribuíram para a realização deste estudo.

Ao prof. José Mauro Peralta, orientador deste trabalho, por nos ter iniciado e guiado através do caminho da ciência, desde os momentos da graduação até a presente data, pela amizade, estímulo constante e pela confiança que sempre nos foi depositada, meu especial agradecimento.

Ao prof. Walter M. R. Oelemann, também orientador deste trabalho, por nos ter iniciado nos caminhos da biologia molecular, pelas discussões, análise e interpretação dos experimentos e, pela amizade.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ, nas pessoas de seu ex-Diretor, Prof. Sérgio Eduardo L. Fracallanza e de seu atual diretor, Prof. José Mauro Peralta e particularmente ao Departamento de Imunologia, a chefia, na pessoa da professora Elvira Saraiva, pelos recursos científicos oferecidos.

À Patrícia Hodos, secretária do Departamento de Imunologia, pelo auxílio constante

Aos colegas de laboratório Regina Helena Peralta, Heloisa Werneck, Gilberto Sperandio, Alexandre e Adriana Vivone, pela amizade, colaboração constante, e também pelos momentos de descontração.

Aos estudantes de iniciação, Giovanni Veríssimo da Costa e Aline Caseca, pelo auxílio técnico e pela amizade.

À todos os colegas do laboratório de Apoio Biotecnológico, pela constante colaboração, e pelos momentos de convívio e amizade.

Ao Dr. José Borges Pereira do Departamento de Medicina Tropical – FIOCRUZ, por selecionar os pacientes que entraram na segunda parte deste trabalho, fornecer as amostras clínicas de indivíduos residentes na área endêmica de Virgem da Lapa, MG, e Sertão da Paraíba e pelas sugestões que muito nos auxiliaram.

Ao Prof. José Adail F. de Castro da Universidade Federal do Piauí, por fornecer as amostras de soro dos indivíduos residentes na área endêmica da Caatinga do Piauí.

Ao Prof. José Rodrigues Coura do Departamento de Medicina Tropical – FIOCRUZ, pela colaboração científica e pelo fornecimento das amostras de soro dos indivíduos residentes em Barcelos, AM.

Ao Dr. Otávio Fernandez pela criteriosa revisão de nosso manuscrito.

À Lúcia Martins Teixeira, pelo carinho, pelo exemplo de profissionalismo e pela pronta colaboração em todos os momentos.

A Carlos Ausberto Bonetti de Souza, pela amizade e apoio técnico indispensável na execução deste trabalho.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, do Instituto Oswaldo Cruz, na pessoa do ex-coordenador Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa, do atual coordenador, Ricardo Lourenço e a secretária Micheli, pelo tratamento e atenção dispensadas ao longo desses anos.

Às Instituições que contribuíram para a execução desta tese: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram e/ou contribuíram para a nossa formação e aperfeiçoamento profissional, mesmo que seus nomes não estejam aqui mencionados.

ABREVIATURAS

A	Adenina
ASEA	"alkaline soluble epimastigote antigen"
BSA	"bovine serum albumin"
Bio	Biotina
BCIP	bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
C	citosina
CRA	antígeno repetitivo <i>citoplasmático</i>
DIG	digoxigenina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	mistura de 2' desoxinucleosídeos 5'trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EIA	ensaio imunoenzimático
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
FRA	antígeno repetitivo flagelar
FN	falso negativo
FP	falso positivo
GEB	guanidina-HCl/EDTA/blood
G	guanina
GP	glicoproteína
HAI	hemaglutinação indireta
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IR	índice de reatividade
Kb	quilobases
KDa	kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIA	"line immunoassay"
LIT	"liver infusion triptose"

LMCo	lise mediada pelo complemento
M	molar
mg	miligrama (s)
mL	mililitro (s)
mM	milimolar
Mr	massa relativa
µg	micrograma
µl	microlitro (s)
NBT	nitro blue tetrazolium
ng	nanograma
p.a.	para análise
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	"polymerase chain reaction"
PM	peso molecular
pmol	picomol (es)
PVP	polyvinylpolypyrrolidone
qsp	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
SAPA	"shed acute-phase antigen"
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	solução salina citratada
SST	solução salina tamponada
T	timina
TMB	3',3',5',5' - tetrametilbenzidina
TBE	tampão tris-borato-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
WB	"western blot"

ÍNDICE

RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
ANEXO 1	xiv
PARTE I	1
INTRODUÇÃO	1
1. A doença de Chagas e o agente etiológico <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
2. Patogênese da doença de Chagas	2
3. Epidemiologia e transmissão	4
4. Diagnóstico laboratorial	5
4.1. Detecção do parasita	5
4.2. Detecção de componentes parasitários	7
4.2.1. Detecção de antígenos	7
4.2.2. Detecção de ácidos nucleicos	8
4.3 Detecção de anticorpos	8
4.3.1. Ensaio imunoenzimáticos	11
4.3.2. Utilização de antígenos purificados ou semi-purificados	15
4.3.3. Utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos	18
5. Avaliação de kits comerciais	23
TRABALHO 1	26
TRABALHO 2	27
TRABALHO 3	28
CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
CONCLUSÕES	39
Parte II	
INTRODUÇÃO	40
1. Características do genoma do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
2. DNA do cinetoplasto (kDNA)	41

3. Métodos de detecção de ácidos nucleicos utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas	42
3.1. Sondas moleculares	42
3.2. Reação em cadeia da polimerase	43
3.2.1. Utilização de seqüências de kDNA como alvo	44
3.2.2. Utilização de seqüências de DNA nuclear como alvo	47
4. Métodos de detecção de produtos amplificados por PCR	50
4.1. Sistemas colorimétricos em placas de microtitulação	51
MATERIAIS E MÉTODOS	53
1. População estudada	53
2. Análises Sorológicas	53
2.1. Imunofluorescência indireta	53
2.2. ELISA	54
2.3. Western Blot	54
2.4. LIA	54
3. Procedimentos para a reação em cadeia da polimerase	55
3.1. Extração de DNA	55
3.2. Condições da reação em cadeia da polimerase	55
3.3. Detecção dos produtos amplificados em gel de agarose	57
3.4. Detecção colorimétrica dos produtos amplificados (PCR-ELISA)	57
3.4.1. Sensibilização das placas de microtitulação com extravidina	57
3.4.2. Hibridização em solução	58
3.4.3. Captura dos produtos amplificados hibridizados e detecção	58
RESULTADOS	60
Tabelas	65
Figuras	72
DISCUSSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 2	110

RESUMO

Na primeira parte deste trabalho foram caracterizadas, por ELISA e Imunofluorescência indireta, um total de 1065 amostras de soro obtidas de indivíduos residentes em quatro diferentes regiões, onde a doença de Chagas é endêmica (Município de Virgem da Lapa, M.G., sertão da Paraíba e Caatinga do Piauí) ou emergente (Município de Barcelos, A.M.). Destas, 520 foram positivas, 505 negativas e 40 indeterminadas. A seguir, as amostras de soro positivas e negativas foram utilizadas na avaliação de 3 kits comerciais de ELISA: Abbott Chagas Antibody EIA, Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit e o BIOZIMA Chagas kit. A sensibilidade e a especificidade relativa variaram de 98,6% a 100% e de 94,7% a 99,8%, respectivamente, sendo o teste de BIOELISACRUZI o mais específico, e o teste BIOZIMA Chagas kit o mais sensível. Posteriormente, as amostras de soro dos quatro painéis foram utilizadas para estabelecer um algoritmo para a interpretação dos resultados de um novo teste, o INNOLIA Chagas kit, que emprega antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos. Este teste apresentou 100% de sensibilidade e 99,3% de especificidade, quando avaliado com um painel independente de amostras de soro de 75 pacientes chagásicos e 148 indivíduos sadios.

Na segunda parte foi feita uma avaliação do desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 85 amostras de sangue de indivíduos residentes em Virgem da Lapa. Uma parte destes indivíduos eram chagásicos e submetidos ou não ao tratamento específico. Os resultados da PCR foram comparados com os dos testes sorológicos e xenodiagnóstico. A PCR apresentou 66% de sensibilidade entre os indivíduos chagásicos não tratados. Também foi desenvolvido um método de detecção colorimétrico dos amplicons (PCR-ELISA) e comparado com a detecção em gel de agarose. Nesta comparação foram observados alguns resultados discordantes, indicando que é necessária uma otimização no método de detecção colorimétrico.

SUMMARY

In the first part of this work, we characterized by ELISA and Indirect Immunofluorescence a total of 1.065 serum samples obtained from individuals living in four different areas where Chagas' disease is either endemic (municipality of Virgem da Lapa, MG; Sertão da Paraíba; Caatinga do Piauí) or emergent (municipality of Barcelos, AM). Five hundred and twenty samples were positive; 505 were negative; and 40 were indeterminate. The positive and negative samples were employed to evaluate three commercial ELISA kits: the Abbott Chagas Antibody EIA; Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit; and BIOZIMA Chagas kit. Relative sensitivity and specificity varied, respectively, from 98.6% to 100% and from 94.7% to 99.8%, with the BIOZIMA Chagas kit being the most sensitive and the BIOELISACRUZI kit the most specific. Subsequently, the samples of the four panels were used to establish an algorithm for the interpretation of the results obtained by a novel test, the INNOLIA Chagas kit which utilizes recombinant antigens synthetic peptides. This assay was 100% sensitive and 99.3% specific when evaluated with an independent panel of sera from 75 chagasic patients and 148 healthy individuals.

In the second part, we assessed the performance of the polymerase chain reaction (PCR) on blood samples obtained from 85 residents of the municipality of Virgem da Lapa, part of whom were chagasic and either submitted or not to specific treatment. The PCR results were compared to those obtained by serologic tests and xenodiagnosis. For the untreated chagasic population the PCR showed 66% sensitivity. We also developed a colorimetric amplicon detection method (PCR-ELISA). However, when this method was compared to the visual detection of amplicons by gel electrophoresis, some discrepant results were observed, indicating the need for further testing and optimization of the PCR-ELISA.

Artigos publicados em periódicos especializados referentes à presente tese:

- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Verissimo da Costa GC, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR & Peralta JM 1998. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 36: 2423-2427.
- Oelemann WMR, Vanderborght BOM, Verissimo da Costa GC, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M & Peralta JM 1999. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. *Transfusion* 39: 711-717.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM & Peralta JM 1999. Screening and confirmation in Chagas disease serology – A contribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 307-308.

Resumos de congressos referentes à presente tese:

- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Costa GCV, Peralta JM, Borges-Pereira J, Castro JAF & Coura JR 1996. Chagas' disease serology: Reactivity classification of serum panels obtained in four different areas in Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 262.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Borges-Pereira J & Peralta JM 1996. Colorimetric detection of polymerase chain reaction-amplified kinetoplast minicircle DNA of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 298.

- Da Costa GCV, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR, Peralta JM & Oelemann WMR 1997. A recombinant antigen and peptide line immunoassay (LIA) as an alternative diagnostic test for Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(Suppl.I): 267.
- Teixeira MGM, Da Costa GC, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR, Peralta JM & Oelemann WMR 1997. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the diagnosis of Chagas' disease. *Resumos do XV Congresso brasileiro de parasitologia* p.176.
- Teixeira MGM, Oelemann WMR, Caseca A, Borges-Pereira J & Peralta JM 1999. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in treated or non-treated patients living in endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. II): 146.

PARTE I

INTRODUÇÃO

1. A doença de Chagas e o agente etiológico *Trypanosoma cruzi*.

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, e foi descrita pela primeira vez pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Chagas 1909), juntamente com sua patogênese, modo de transmissão e os variados quadros clínicos que podem se apresentar no homem.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e pertence ao sub-gênero *Schizotrypanum*. Em seu ciclo de vida natural apresenta dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado. Como hospedeiros invertebrados ou vetores tem-se conhecimento de numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae, sendo os principais transmissores o *Triatoma infestans*, o *Rhodnius prolixus* e o *Panstrongylus megistus*. Segundo Barreto (1979), já foram descritas mais de cem espécies de mamíferos como hospedeiros vertebrados, incluindo reservatórios selvagens e domésticos. No ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* encontramos três formas evolutivas: tripomastigota (no vetor, em cultura de células e no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado), amastigota (no interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células) e epimastigota (em cultivo axênico e no tubo digestivo do inseto vetor). Essas formas são distinguíveis fisiológica e morfologicamente. As diferentes formas são caracterizadas pela posição do cinetoplasto (rede de DNA presente no interior da mitocôndria) em relação ao núcleo, o trajeto intracelular do flagelo e o ponto em que este emerge do citoplasma.

Os epimastigotas são as formas de multiplicação encontradas no intestino médio do hospedeiro invertebrado, onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (formas que não se multiplicam, mas são altamente infectantes), e que se acumulam na ampola retal (porção final do intestino). A maioria dos triatomíneos

defeca imediatamente após a alimentação e, desta maneira, os parasitas são liberados juntamente com as fezes ao redor da área picada pelo inseto. Os tripomastigotas são capazes de invadir o hospedeiro vertebrado por soluções de continuidade da pele ou das mucosas e conjuntivas e infectar diferentes tipos de células. No interior das células, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (formas de multiplicação intracelular encontradas no hospedeiro vertebrado), as quais multiplicam-se intensamente, podendo permanecer nas células dos tecidos por longos períodos de tempo e, posteriormente, diferenciarem-se em formas tripomastigotas sangüícolas. Após a ruptura das células parasitadas, estas formas podem chegar à corrente sangüínea e linfática, de onde se disseminam para outros tecidos (fundamentalmente as fibras musculares lisas, estriadas ou cardíacas e células do sistema fagocítico mononuclear). Os tripomastigotas circulantes podem ser captados pelo triatomíneo durante a alimentação, se diferenciam, novamente, após algumas horas, em epimastigotas dando continuidade ao ciclo (Brener 1979).

2. Patogênese da doença de Chagas

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases bem definidas: uma fase inicial, aguda, e outra tardia, crônica. A fase aguda tem início duas a três semanas após a infecção, podendo este período variar em função da via de penetração, do inóculo, da cepa de *Trypanosoma cruzi* e das condições do paciente e pode durar aproximadamente de dois a quatro meses. Nas lesões de porta de entrada pode ocorrer a formação, após um período de incubação, de um nódulo vermelho, conhecido como "chagoma de inoculação". Quando este local está próximo da mucosa do olho, um edema unilateral pode se desenvolver, conhecido como sinal de Romana. Nesta fase a parasitemia é patente e, portanto, os parasitas são facilmente encontrados no sangue e tecidos e os sintomas clínicos podem ser intensos, moderados ou até mesmo ausentes, podendo esta fase passar despercebida. Outras manifestações clínicas incluem: febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, náusea, vômitos, diarréia e edema de extremidades. Nas formas agudas graves, surgem quadros de meningoencefalite, ou miocardite aguda que levam à insuficiência cardíaca congestiva, causada pela reação inflamatória aguda das células infectadas do miocárdio, podendo culminar em êxito letal (Rassi, Rassi Jr & Rassi 1999).

A fase crônica, em alguns casos, tem início logo após o período agudo e pode apresentar três formas definidas: indeterminada, cardíaca e digestiva. A forma indeterminada ou assintomática, pode durar várias décadas e se caracteriza pela ausência de manifestações clínicas. Tais casos são reconhecidos pela persistência de reações sorológicas positivas e pela rara detecção do parasita no sangue. A forma indeterminada da doença tem um prognóstico incerto, podendo evoluir e afetar um ou mais órgãos internos, especialmente, coração, esôfago e intestino grosso e, às vezes, também o sistema nervoso periférico (Andrade 1999). A forma cardíaca se caracteriza por alterações no miocárdio que, geralmente, evoluem lentamente. Na miocardite chagásica crônica as células parasitadas são raras, observando-se um infiltrado inflamatório linfocitário crônico, com presença abundante de macrófagos e células gigantes (Andrade 1999). A forma digestiva se apresenta com vários graus de disfunção gastrointestinal, principalmente a redução de coordenação do peristaltismo pelo sistema nervoso autônomo e a perda de tônus muscular na maior parte do trato intestinal, levando à atrofia dos esfíncteres e os conseqüentes alargamentos do esôfago (megoesôfago) e do cólon (megacólon) (Rezende & Moreira 1999). Já foi também descrita a forma mista, que resulta da presença simultânea de manifestações cardíacas e digestivas num indivíduo. Entretanto, as causas que determinam a evolução da doença ainda não foram claramente definidas e, até o momento, não se dispõem de critérios prognósticos adequados (Laranja et al. 1956, Pereira, Willcox & Coura 1985, Borges-Pereira 1997).

A ocorrência do fenômeno de autoimunidade na doença de Chagas crônica tem sido sugerida devido à ausência de parasitas e presença de anticorpos de reatividade cruzada (Santos-Buch & Teixeira 1974, Teixeira & Santos-Buch 1975, Ribeiro dos Santos et al. 1992, Cunha-Neto et al. 1996, Kierszenbaum 1996 e 1999). No entanto, evidências da presença do parasita na lesão têm sido mostradas (Jones, 1993, Tarleton et al. 1997 e 1999). Portanto, ainda não se chegou a um consenso em relação ao mecanismo imunológico e ao papel dos antígenos parasitários na evolução da lesão tecidual, durante a doença de Chagas crônica. Duas revisões bem recentes (Kierzensbaum 1999 e Tarleton 1999), nos levam a acreditar que os dois mecanismos (autoimunidade e presença do parasita) podem ocorrer simultaneamente e não se deve descartar nenhum deles.

3. Epidemiologia e Transmissão

A doença de Chagas constitui, pela sua vasta distribuição, altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos grandes problemas de saúde pública em países da América do Sul e Central, onde é amplamente distribuída em áreas periurbanas e rurais de países tropicais e subtropicais (do México até Argentina e Chile). A distribuição geográfica da infecção humana por *T. cruzi* se estende desde o sul dos Estados Unidos, até a Argentina e Chile (WHO 1991). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) existem entre 16 a 18 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* na América Latina e cerca de 50.000 indivíduos chagásicos morrem anualmente (Moncayo 1999). Estima-se que as áreas endêmicas conhecidas estejam habitadas por, aproximadamente, 90 milhões de pessoas, com risco direto de infecção pelo *T. cruzi*. As precárias condições socioeconômicas da população de áreas endêmicas, assim como fatores bioecológicos, podem contribuir para a manutenção da infecção em níveis endêmicos (Moncayo 1999).

A maioria dos casos de infecção humana pelo *T. cruzi* ocorre em áreas rurais, através do contato com as fezes de triatomíneos infectados. Contudo, o Programa de Controle de Vetores tem abolido quase completamente este modo de transmissão (Dias & Schofield 1999). No Brasil, alguns estudos relatam muito poucos e até ausência de indivíduos chagásicos abaixo de 13 anos no estado de Minas Gerais (Dias 1987, Borges-Pereira et al. 1989). Por outro lado, a transmissão por transfusão sanguínea é considerada o segundo mecanismo mais importante, principalmente em países onde não ocorre a transmissão por vetores, como é o caso dos Estados Unidos e Canadá, onde casos de doença de Chagas aguda, por transfusão de sangue, têm sido registrados (Grant et al. 1989, Nickerson et al. 1989, Schmuñis 1991, Kirchhoff 1993). Infelizmente, nem todos os países da América Latina realizam sorologia para doença de Chagas em 100% dos doadores de sangue (Schmuñis 1999). Portanto, a migração de pessoas infectadas para áreas urbanas e países não endêmicos constitui um problema para a segurança das transfusões sanguíneas. Deve ainda ser mencionada a transmissão congênita, causa de abortos, natimortos e prematuridade em áreas em que a doença é endêmica (Dias, 1979). A transmissão via transplante de órgãos (Villalba et al. 1992, Dias 1999), contaminação oral (Shikanai-Yasuda et al. 1991) e a contaminação acidental em laboratórios também

têm sido descritas (Israelski, Sadler, Araújo 1988, Almeida et al. 1994).

4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela clínica e epidemiologia e confirmado, pelo diagnóstico laboratorial, que oferece importantes subsídios, desde que realizado com técnicas apropriadas, reagentes adequados e seguindo as boas práticas de laboratório.

Os exames laboratoriais devem ser direcionados em função da fase da infecção. Assim, nos casos de suspeita de fase aguda, devido a elevada parasitemia que lhe é peculiar, deve ser priorizada a detecção do parasita. Enquanto, na suspeita de infecção crônica, a solicitação deve ser primariamente dirigida à pesquisa de anticorpos específicos contra o parasita, já que nesta fase a parasitemia é muito baixa.

4.1. Detecção do parasita

O método de detecção direta deve ser empregado em toda suspeita de fase aguda ou de reativação decorrente de doença ou tratamento imunossupressor. O método baseia-se na detecção de formas tripomastigotas, através da observação de uma gota de sangue a fresco (entre lâmina e lamínula) ao microscópio. Além deste procedimento, utiliza-se a técnica de esfregaço sangüíneo corado pelo Giemsa ou outro método derivado de Romanowsky, para caracterização morfológica do parasita, que é importante em áreas onde existe também o *Trypanosoma rangeli*, que pode ser confundido com o *T. cruzi* (Camargo & Takeda 1979). Para aumentar a probabilidade de detecção de parasitemia podem ser utilizados métodos de concentração dos parasitas, tais como: gota espessa de sangue corada, micro-hematócrito, técnica de Strout, QBC e técnica de Ficoll-Hypaque (Luquetti & Rassi 1999).

Durante a fase crônica, a pesquisa do parasita é indicada para confirmação diagnóstica em casos de sorologia duvidosa, monitoramento de pacientes submetidos a tratamento específico (controle de cura) ou isolamento do parasita (WHO 1991, Chiari 1992). Nesta fase, torna-se necessária a aplicação de métodos que possibilitem a amplificação da população de parasitas, para posterior detecção. Até o momento, os métodos que vêm sendo empregados são o xenodiagnóstico e a hemocultura. O

xenodiagnóstico foi, inicialmente, introduzido no estudo da doença de Chagas por Brumpt (1914). Este método utiliza o vetor (triatomíneo) como se fosse um meio de cultura biológico. Para realizá-lo são empregadas 40 ninfas de 3^o e/ou 4^o estágio mantidas em laboratório e livres de infecção pelo *T. cruzi*. Estas são distribuídas em 4 caixas e fixadas por uma tira de elástico à pele do indivíduo com suspeita da infecção. Os insetos sugam o sangue do indivíduo, durante aproximadamente 20 a 30 minutos. Após 30 a 60 dias as fezes e o conteúdo intestinal dos insetos são examinados ao microscópio (Cerisola, Rohwelder & Prado 1971). Este método apresenta algumas limitações, tais como: procedimentos laboriosos, manutenção dos insetos, reações alérgicas à picada do inseto e uma baixa sensibilidade (aproximadamente 50%) (Hoff et al. 1979, Coura et al. 1991).

A hemocultura baseia-se na inoculação de sedimento leucocitário, correspondente a 30 ml de sangue, em meio de cultura (LIT). As culturas devem ser incubadas por períodos longos e examinadas periodicamente. Os primeiros resultados observados utilizando-se esta metodologia, mostraram sensibilidade muito baixa (25,7%) (Chiari & Brener, 1966) e por isso foi deixada em segundo plano por algum tempo. A positividade na hemocultura parece depender tanto da natureza do meio de cultura, como da técnica empregada e modificações na metodologia têm proporcionado melhores resultados. Assim coletar maiores volumes de sangue do paciente, retirar fatores inibidores do crescimento do parasita, prolongar o tempo de cultivo e realizar o teste repetidas vezes são algumas das modificações introduzidas na metodologia que proporcionaram maiores índices de sensibilidade (44% e 55%) (Minter-Goedbloed & Marshall 1978, Chiari et al. 1989). Mais recentemente, Luz et al. (1994) introduziram outras modificações, tais como, diminuição do período de processamento do sangue (até 30 minutos), homogeneização suave e exame até 120 dias de cultivo. Com estas modificações os autores obtiveram positividade de 79% e 94% dos pacientes, com um ou três testes, respectivamente.

Entretanto, como o xenodiagnóstico apresenta positividade em torno de 50%, é recomendada a utilização dos dois métodos para aumentar a possibilidade de se demonstrar a existência da parasitemia nas infecções crônicas (Luquetti & Rassi 1999).

4.2. Detecção de componentes parasitários

4.2.1. Detecção de antígenos

Além do fato que a parasitemia de pacientes na fase crônica é muito escassa e sua detecção apresenta sensibilidade muito baixa, existem casos em que não se consegue detectar a presença de anticorpos. Na tentativa de minimizar estes problemas, alguns testes para a detecção de antígenos parasitários têm sido desenvolvidos. Vários investigadores têm detectado a ocorrência de antígenos ou complexos antígeno-anticorpo, pela técnica de ELISA, no soro e/ou urina de pacientes chagásicos de diferentes idades, nas fases aguda e crônica (Araújo, Chiari & Dias 1981, Kahn et al. 1983, Corral et al. 1984, Freilij et al. 1987). Corral et al. (1984), detectaram pela primeira vez a presença de antígenos de *T. cruzi* na urina de indivíduos chagásicos na fase aguda e de pacientes com infecção congênita. Freilij et al. (1987), descreveram a detecção e caracterização parcial de duas glicoproteínas de 80 e 55 KDa, em amostras de urina de pacientes na fase aguda, que foram consideradas importantes para avaliações adicionais.

Outros métodos também têm sido empregados. Assim sendo, Katzin et al. (1989) desenvolveram um método de detecção de antígeno de *T. cruzi*, em urina, pelo teste de aglutinação pelo látex. Estes autores detectaram antígenos parasitários em 54 das 58 amostras de urina de pacientes chagásicos crônicos testados. A presença de antígenos específicos de *T. cruzi* na urina pode estar associado com a infecção ativa ou recente (Freilij et al. 1987, Katzin et al. 1989).

Umezawa et al. (1993), descreveram a identificação de um antígeno de 150 - 160 kDa na urina de 60% dos indivíduos chagásicos crônicos testados, utilizando um anticorpo monoclonal originado para um antígeno recombinante imunodominante, denominado H-49. Recentemente, Corral et al. (1996), desenvolveram um teste de ELISA de captura de antígeno, utilizando anticorpos monoclonais, para detecção de antigenúria em pacientes chagásicos com infecção aguda, congênita e crônica. Os autores conseguiram detectar antigenúria em todos os pacientes testados. Embora tenha sido uma amostragem pequena (12 pacientes), os resultados são promissores pelo fato das amostras de urina terem sido utilizadas sem passarem por processos de concentração.

4.2.2. Detecção de ácidos nucleicos

Nos últimos anos, tem-se procurado estabelecer métodos de detecção de fragmentos genômicos do parasita através de técnicas de biologia molecular. A amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase ("Polymerase Chain Reaction" - PCR), vem sendo aplicada para a detecção de segmentos de DNA, específicos de *T. cruzi*, em líquidos orgânicos de indivíduos infectados (Sturm et al. 1989, Ávila et al. 1991, Diaz, Nussenzweiz & Gonzales 1992, Russomando et al. 1992, Ávila et al. 1993, Britto et al. 1995, Junqueira, Chiari & Wincker 1996, Silber et al. 1997, Gomes et al. 1998, Gomes et al. 1999). Esta metodologia será discutida na segunda etapa deste trabalho.

4.3. Detecção de anticorpos

A demonstração de anticorpos anti-*T. cruzi* por meio de testes sorológicos é de grande importância no diagnóstico da infecção chagásica. Além das limitações do diagnóstico parasitológico, o diagnóstico clínico é dificultado pela elevada porcentagem de formas inaparentes da doença. Ao contrário, o diagnóstico sorológico se beneficia do fato dos anticorpos aparecerem no sangue muito cedo, ainda na fase aguda da infecção, e de se manterem continuamente ao longo de toda a fase crônica da doença (Sá Ferreira et al. 1983, Araújo, Heilman & Tighe 1984). Além da facilidade de execução, os testes sorológicos fornecem informações de valor diagnóstico em prazos curtos, de poucos minutos a algumas horas. Assim, a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* é o método de eleição para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas na fase crônica, sendo o mais econômico, rápido e eficaz. Entretanto, devido à importância que representa no diagnóstico, a sorologia deve se apoiar em testes de alta confiabilidade. Deve ser enfatizado que, na triagem de doadores de sangue, resultados falso-negativos podem ocasionar infecções pós-transfusionais, e resultados falso-positivos podem ter sérias implicações em problemas pessoais e sociais. Os títulos de anticorpos são variáveis e ocasionalmente um indivíduo que apresenta título flutuante ao redor do limite de reatividade de um dado teste, pode dar origem a um resultado falso-negativo (Rassi, Amato-Neto & Siqueira 1969). Têm sido descritos alguns raros casos de indivíduos sorologicamente negativos, residentes em áreas endêmicas e que apresentam sinais clínicos da doença, com eventual parasitemia

determinada pelo xenodiagnóstico (Luquetti 1987, Brenière et al. 1984). Entretanto, o diagnóstico sorológico da infecção chagásica tem apresentado alguns problemas, em relação à padronização de reagentes e de procedimentos técnicos. Estes fatos foram muito bem definidos em trabalhos realizados nas décadas de 60 a 80 (Almeida & Siqueira 1960, Prata et al. 1975, Teixeira & Pereira 1981, Camargo et al. 1986). Prata et al. (1975), compararam os resultados de reações de fixação do complemento entre três laboratórios e observaram altas discrepâncias: 15% dos soros tinham reações divergentes entre o 2º e o 3º laboratório, 22% entre o 1º e 3º e 29% entre o 1º e o 2º. Entretanto, foram feitas tentativas no sentido de melhorar esse quadro. Camargo et al. (1977), fazendo um estudo comparativo entre 4 testes sorológicos (fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação), com 3.624 amostras de soros, observaram concordância total de resultados em 97% das amostras. Os autores atribuíram o bom desempenho dos testes em decorrência de uma padronização satisfatória. Em outra investigação, Camargo et al. (1986) desenvolveram um estudo onde foi feita a avaliação de dois painéis de soros por três laboratórios localizados nos Estados Unidos, Argentina e Brasil. Na primeira avaliação, cada laboratório padronizou seus testes e estabeleceu critérios próprios para o diagnóstico, o que ocasionou grandes divergências. Em vista disso, foram estabelecidos protocolos para todos os testes, para serem utilizados pelos 3 laboratórios. Em uma segunda avaliação, foram observados resultados bem mais uniformes. Portanto, a padronização dos testes sorológicos tem merecido uma atenção especial nos últimos anos, a fim de que se possa obter resultados confiáveis e de auxílio ao diagnóstico confirmatório.

Outro fato que contribui para as variações observadas nos testes sorológicos, é a variedade de preparações antigênicas utilizadas. Os antígenos empregados geralmente variam de células integras e extratos brutos a extratos purificados ou semi-purificados. Por outro lado, diferenças antigênicas são observadas entre os diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Kloetzel, Camargo & Giovannini 1975, Araújo & Guptill, 1984, Primavera et al. 1990). As formas amastigotas e tripomastigotas exigem métodos mais laboriosos (cultivo celular e posterior purificação para retirada de restos celulares) para sua obtenção. Entretanto, os epimastigotas são facilmente cultivados em meio de cultura líquido e são ricos em antígenos conservados. Diferentes lotes do mesmo reagente podem levar a diferenças

significativas de reatividade se não se levar em consideração o desenvolvimento de procedimentos de padronização (Hoshino-Shimizu et al. 1982, Luquetti 1990). Um outro grande problema é a reatividade cruzada, observada entre *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos relacionados (Camargo 1966, Camargo & Rebonato 1969, Nery-Guimarães et al. 1969, Saldaña & Souza 1996).

Vários testes têm sido desenvolvidos utilizando frações imunodominantes de *T. cruzi*, como antígeno, ao invés de extratos brutos ou parcialmente purificados, com a perspectiva de torná-los mais eficientes. O estudo de componentes antigênicos presentes em todas as cepas e clones de *T. cruzi*, também podem contribuir nesse sentido. Entre várias frações antigênicas reconhecidas em diferentes estágios de desenvolvimento, algumas têm sido objeto de estudo, como candidatas a serem empregadas em diagnóstico. Para a obtenção de frações puras, algumas técnicas têm sido empregadas, tais como: cromatografia de afinidade (Scharfstein et al. 1983, Schechter et al. 1983) e filtração em gel (Schechter et al. 1986).

Existe uma grande variedade de testes sorológicos que foram aplicados ao diagnóstico da infecção chagásica, tais como: reação de fixação de complemento (Guerreiro & Machado 1913, Almeida & Fife 1976), reação de aglutinação direta (Muniz & Freitas, 1944), reação de aglutinação pelo látex (Hungerer Enders & Zwisler 1970), reação de hemaglutinação indireta (HAI) (Cerisola, Chaben & Lazzari 1962), floculação (Hoshino-Shimizu, Camargo & Umezawa 1975), reação de imunofluorescência indireta (IFI) (Fife & Mushel, 1959, Camargo, 1966) e ensaios imunoenzimáticos (EIA), que serão descritos a seguir. Cada um destes testes apresenta características próprias e, além disso, diferentes antígenos têm sido empregados, levando a resultados com níveis variáveis de sensibilidade e especificidade. Atualmente os testes mais utilizados e que estão sendo comercializados são os testes de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos no formato de ELISA.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização de pelo menos duas técnicas de princípios diferentes para o diagnóstico da infecção chagásica em laboratórios de rotina e na triagem sorológica de doadores em serviços de hemoterapia (WHO 1991 e 1993). Para ser considerada positiva a amostra de soro deve mostrar reatividade nas duas metodologias.

4.3.1. Ensaaios imunoenzimáticos

Voller et al. (1975) foram os primeiros a aplicar esta técnica no diagnóstico da infecção chagásica, no qual o antígeno era fixado em placas de poliestireno e a leitura feita visualmente ou por espectrofotometria. Os EIAs que utilizam suportes sólidos foram tradicionalmente denominados de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay").

O teste de ELISA abriu amplas perspectivas na sorologia da doença de Chagas, por apresentar alta sensibilidade e especificidade, leitura objetiva e condições para ser automatizado. A automação agiliza a obtenção do resultado final e evita os erros técnicos, contribuindo para um diagnóstico mais eficiente.

Devido às vantagens que o teste de ELISA apresenta, este tem sido empregado amplamente para avaliação de várias e diferentes preparações antigênicas, tais como: antígenos brutos (Ferreira et al. 1991), antígenos purificados ou semi-purificados (Schechter et al. 1983, Schechter et al. 1985, Camargo et al. 1986, Lemesre et al. 1986, Carboneto et al. 1990, Gazzinelli et al. 1993), antígenos recombinantes (Almeida et al. 1990, Krieger et al. 1992, Cetron et al. 1992, Carvalho et al. 1993, Gruber & Zingales 1993, Paranhos-Bacalla et al. 1994, Krautz et al. 1994, Godsel et al. 1995, Umezawa et al. 1999) e peptídeos sintéticos (Vergara et al. 1992, Burns et al. 1992, Peralta et al. 1994, Houghton et al. 1999). Recentemente Almeida et al. (1997), descreveram um teste de ELISA quimioluminescente (CL-ELISA) empregando antígenos brutos e purificados de *T. cruzi*. O teste apresentou elevada sensibilidade (100%), pois permite trabalhar com diluições do soro 20 vezes maiores que no ELISA convencional. Portanto, é um teste bastante promissor, mas para sua utilização é necessário que o laboratório possua um luminômetro.

Outras configurações de EIA para detecção de anticorpos têm sido descritas. Dentre elas encontra-se o teste de "dot-blot", no qual pequenas gotas do antígeno são fixadas diretamente em membrana de nitrocelulose (a qual apresenta grande afinidade de ligação com proteínas), seguido por incubação com soro e detecção dos imunocomplexos por reação enzimática.

Alguns pesquisadores têm empregado o teste de "dot blot" observando índices de sensibilidade e especificidade próximos de 100% (Araújo 1985, Hubsch et al. 1988). Lorca et al. (1992), utilizaram a técnica de "dot blot" para avaliar antígenos

recombinantes. Lissaldo et al. (1994), avaliaram um antígeno obtido de formas epimastigotas de *T. cruzi* solubilizado em meio alcalino (ASEA), empregando o teste de "dot blot". Os autores observaram sensibilidade de 100% e especificidade de 95.6% e sugeriram que o teste fosse utilizado em estudos soropidemiológicos. As vantagens do teste são que o antígeno ligado à membrana de nitrocelulose é estável por um longo tempo a 4°C, nenhum equipamento especial é necessário para sua execução e a leitura é apenas visual demonstrando que o método pode ser aplicado para estudos soropidemiológicos em áreas rurais. Entretanto, apresenta o inconveniente de ter a leitura subjetiva.

Outra configuração que merece destaque é o teste de "Western blot" (WB) ou "imunoblotting". Este método permite analisar, separadamente, a reatividade dos anticorpos presentes no soro frente as várias proteínas existentes em uma mistura antigênica complexa. Nesta técnica as proteínas são separadas por eletroforese e depois transferidas para a membrana de nitrocelulose. A membrana é então incubada com o soro suspeito e depois com uma anti-IgG humana marcada com uma enzima, sendo freqüentemente utilizada a peroxidase ou a fosfatase alcalina. A revelação é feita com um substrato cromogênico adequado o que origina um produto insolúvel que precipita formando uma banda. O método foi descrito pela primeira vez em 1979, simultaneamente por Renart, Reiser & Stark e Towbin, Staehlin & Gordon.

Em relação à infecção chagásica, a técnica de WB foi inicialmente empregada para analisar a reatividade de cepas, clones e formas evolutivas com soros de pacientes chagásicos ou animais infectados (Snary et al. 1981, Araújo, Heilman & Tighe 1984, Araújo & Tighe, 1984., Lanar & Manning, 1984, Rangel-Aldao et al. 1986, Israelski, Sadler & Araújo 1988, Morgado et al. 1989, Chiller, Samudio & Zoulek 1990). Os padrões de reatividade das diferentes formas evolutivas, apresentam diferenças quantitativas e presença de bandas estágio- específicas (Lanar & Manning, 1984, Rangel-Aldao et al. 1986, Israelsky, Sadler & Araújo 1988). Contudo, outros autores (Araújo Heilman & Tighe 1984, Araújo & Tighe 1984, Israelski, Sadler & Araújo 1988) demonstraram que a maior parte dos componentes parasitários permanecem estáveis ao longo do ciclo de vida do parasita. Rangel-Aldao et al. (1986), observou que não existem diferenças importantes de reatividade entre cepas e clones do *T. cruzi*, embora evidências contrárias tenham sido apresentadas (Snary et al. 1981, Lanar & Manning 1984).

A complexa composição antigênica do *T. cruzi* e a variabilidade antigênica observada entre cepas e estágios evolutivos, têm dificultado a análise de reatividade pelo WB, com soros de pacientes chagásicos. As primeiras avaliações da técnica de WB existentes na literatura descrevem um complexo padrão de reatividade de bandas com peso molecular variando de 15 a 200 kDa (Araújo 1986, Rangel-Aldao et al. 1986, Morgado et al. 1989, Chiller, Samudio & Zoulek 1990).

A aplicação do WB também pode ser de grande utilidade para a análise das frações antigênicas em relação à especificidade Araújo (1986), analisando a reatividade de soros de pacientes infectados com *T. cruzi* e *Leishmania sp* com extrato antigênico de formas epimastigotas de *T. cruzi*, observou uma intensa reatividade cruzada, porém definiu alguns antígenos que foram especificamente reconhecidos por pacientes chagásicos, o que foi confirmado por Morgado et al. (1989). Por outro lado, Chiller, Samudio & Zoulek (1990), foram capazes de distinguir soros de pacientes com infecção chagásica, leishmaniose tegumentar e infecção dupla, observando diferenças no padrão de reatividade dos diferentes grupos de pacientes. Os primeiros estudos de avaliação da reatividade de proteínas de *T. cruzi*, pelo teste de WB, com soros de pacientes chagásicos, apresentavam dificuldades para serem interpretados e comparados, devido a utilização de diferentes metodologias (Araújo 1986, Rangel-Aldao et al. 1986, Morgado et al. 1989, Chiller, Samudio & Zoulek 1990). Schechter & Nogueira (1988) demonstraram que havia uma variação no perfil de proteínas, quando determinados parâmetros eram modificados na metodologia de preparação do antígeno, tais como: velocidade de centrifugação, métodos de solubilização de proteínas e sistemas de eletroforese. Portanto, a padronização deste método e a definição de critérios para a interpretação dos resultados eram necessários. Com base nos problemas existentes Teixeira et al. (1994), desenvolveram e avaliaram um teste de WB, empregando como antígeno a fração citossólica, obtida de formas epimastigotas da cepa Y. Neste estudo foi feita uma análise da reatividade das amostras de soros com o antígeno, de modo a evidenciar as frações antigênicas específicas (reconhecidas somente por soros de indivíduos chagásicos) com maiores índices de reatividade. Também foram evidenciadas as frações antigênicas inespecíficas (reconhecidas por soros de indivíduos sadios e/ou indivíduos infectados com outros microrganismos). De acordo com essa análise foi definido um padrão de reatividade específico, capaz de auxiliar

no diagnóstico confirmatório da doença de Chagas. Foram incluídas neste padrão 7 bandas (14, 19, 27, 30, 34, 37, 75 kDa), com as quais, as amostras de soro de indivíduos chagásicos apresentaram índice de reatividade acima de 75% e não mostraram reatividade cruzada com outras infecções. Este teste apresentou 99,3% de sensibilidade e 100% de especificidade.

O método de WB também foi utilizado para diferenciar infecção causada pelo *T. cruzi* e *T. rangeli*, empregando soros de uma área endêmica da Venezuela, onde os dois parasitas coexistem (O'Dally et al. 1994). Malchiodi et al. (1994) utilizaram a técnica de WB para identificar os antígenos responsáveis pela reatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania*. Os autores empregaram soros de indivíduos oriundos de regiões endêmicas para as 2 infecções e descreveram alguns casos de infecção mista. Umezawa et al. (1996) descreveram um teste de WB empregando uma fração antigênica excretada e secretada por formas tripomastigotas em cultivo celular, denominada de TESA ("trypomastigote excreted-secreted antigen"), capaz de diferenciar a infecção chagásica crônica da aguda ou congênita. O teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade e sua aplicação foi sugerida como teste confirmatório, quando a sorologia convencional se apresentar duvidosa. Mais recentemente, Mendes et al. (1997) e Reiche et al. (1998) também avaliaram o emprego da técnica de WB para o diagnóstico da doença de Chagas. Nos dois estudos foram obtidos ótimos índices de especificidade (100%) e foram definidos critérios de interpretação dos resultados. Ambos os autores sugeriram que o teste seja utilizado como método alternativo para auxiliar a sorologia convencional.

Tozetti (1997), desenvolveu um estudo onde foram analisados antígenos obtidos de formas epimastigotas de 6 cepas de *T. cruzi* provenientes da América Latina, utilizando diferentes processos de obtenção. A avaliação por WB mostrou a presença de algumas bandas comuns entre as cepas (135,116,72,65,35,30,27 e 20 kDa), porém também foram encontradas variações de algumas frações antigênicas.

Na maioria dos trabalhos publicados, onde foi avaliada a técnica de WB e sugerida a sua aplicação como um teste alternativo para auxiliar o diagnóstico da doença de Chagas, foram empregadas formas epimastigotas da cepa Y. Em parte, este fato já contribui para uma uniformização da técnica, porém as metodologias empregadas para obtenção do antígeno e procedimentos de eletroforese foram diferentes, o que pode ocasionar resultados divergentes. Portanto, para que os testes

de WB forneçam resultados reprodutíveis entre diferentes laboratórios, é necessário que os procedimentos técnicos sejam bem padronizados e seguidos a risca. Apesar de várias avaliações já terem sido feitas, a técnica de WB ainda vem sendo empregada apenas em laboratórios de pesquisa.

4.3.2. Utilização de antígenos purificados ou semi-purificados:

A existência de reações cruzadas (devido a presença de antígenos comuns entre *T. cruzi*, *T. rangeli* e *Leishmania* sp), principalmente com soros de indivíduos com leishmaniose, tem estimulado pesquisadores a procurar antígenos mais específicos, através da purificação de componentes do parasita.

Schechter et al. (1983) investigaram a sensibilidade de um teste de ELISA empregando uma glicoproteína de 90 kDa, denominada GP-90, purificada por cromatografia de afinidade com lectinas. Foi detectado uma sensibilidade de 96,6% e nenhuma reatividade cruzada foi observada com soro de pacientes com infecção por *Leishmania* sp ou *T. rangeli*. A GP-90 parecia ser promissora pelas suas propriedades de estar presente em todas as formas evolutivas do parasita, assim como em diferentes cepas estudadas (Nogueira et al. 1981, Zingales 1984). Em uma avaliação posterior, com esta mesma glicoproteína foi constatada reatividade com soros de pacientes com leishmaniose visceral (Schechter et al. 1985).

Uma glicoproteína de Mr de 25 kDa, foi descrita por Scharfstein et al. (1983) como sendo específica de *T. cruzi* e apresentando 96,5% de sensibilidade, quando foi empregado no ensaio radiométrico (Scharfstein et al. 1985). Posteriormente, Camargo et al. (1986), fizeram uma avaliação da GP-25 em teste de ELISA e evidenciaram especificidade e sensibilidade de 99%. Mas tarde, Scharfstein et al. (1986) isolaram e caracterizaram um antígeno primário, a partir do qual a GP25 foi derivada por proteólise, uma glicoproteína de superfície de 57/51 kDa (GP57/51). Análises imunoquímicas mostraram que a GP57/51 era expressa por todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi* e estava presente em todas as cepas/isolados testadas. Posteriormente, Gazzinelli et al. (1993) realizaram ensaios por ELISA, empregando o antígeno GP57/51 purificado e foram capazes de determinar a cura, em 70% de pacientes chagásicos analisados depois de serem submetidos à quimioterapia específica, sugerindo a utilização do teste para monitoramento de cura, pois este teste mostrou alta correlação de resultados com o teste de lise mediada pelo complemento (LMCo).

Carboneto et al. (1990) avaliaram um antígeno de Mr de 52 KDa obtido por cromatografia de afinidade com anticorpo monoclonal e observaram 100% de sensibilidade com soros de pacientes chagásicos crônicos e nenhuma reatividade com soro de pacientes com leishmaniose. Os autores sugeriram a utilização desta proteína no diagnóstico diferencial entre doença de Chagas e leishmaniose.

Lemesre et al. (1986) descreveram um teste de ELISA competitivo (C-ELISA), empregando um anticorpo monoclonal contra um epítipo presente numa glicoproteína de Mr de 72 KDa. Os autores obtiveram 100 % de especificidade e 96,6% de sensibilidade no teste quando soros de pacientes em fase crônica foram usados. Entretanto, Cuna et al. (1989), fazendo uma reavaliação do teste em áreas em que coexistiam infecções mistas com *L. braziliensis*, observaram uma sensibilidade de 94% em pacientes chagásicos e 89% em pacientes com infecções mistas, quando comparados aos teste de IFI e ELISA.

Devido ao fato das formas epimastigotas serem de fácil obtenção e de baixa infectividade, elas têm sido mais utilizadas para o preparo de antígenos. Entretanto, recentemente vários autores têm tentado obter antígenos de formas tripomastigotas, uma vez que estes antígenos têm demonstrado uma maior especificidade, e podem ser utilizados em testes empregados para controle de cura após terapêutica específica (Gazzinelli et al. 1993, Krautz et al. 1994). Este fato, já havia sido relatado por Krettl, Cançado & Brener (1982), quando relacionou a presença de anticorpos líticos com a infecção ativa. Os anticorpos líticos detectados pelo teste de LMCo reconhecem antígenos na superfície de tripomastigotas vivos e circulam somente durante a infecção crônica ativa (Krettl & Brener 1982). A reação de LMCo foi o primeiro teste descrito para ser empregado como controle de cura em pacientes submetidos a terapêutica específica (Krettl & Brener 1982). Contudo, vários grupos de pesquisadores apontaram dificuldades metodológicas para a inclusão do teste na rotina de laboratórios clínicos. Devido a estes problemas, alguns antígenos obtidos de formas tripomastigotas têm sido empregados em testes imunológicos na tentativa de substituir o teste de LMCo para monitorar o tratamento da doença de Chagas (Gazzinelli et al. 1993, Krautz 1994, Almeida et al. 1997).

Martins et al. (1985) identificaram pela primeira vez um epítipo que estimulava a produção de anticorpos líticos, como sendo uma glicoproteína de 160 kDa. Posteriormente, esta glicoproteína de 160 kDa foi isolada e purificada por Norris, Harth & So (1989). Entretanto, não foi possível ter dados conclusivos quanto à associação desse antígeno com aqueles que induzem os anticorpos líticos.

Gazzinelli et al. (1993), avaliaram um antígeno solúvel de tripomastigotas obtido de

sobrenadante de cultura de células (AgSb), empregando soros de indivíduos tratados que apresentavam testes parasitológicos negativos e observaram total correlação de resultados com o teste de LMCo. Neste mesmo estudo foi demonstrado que uma alta proporção dos anticorpos detectados pela sorologia convencional (isto é, testes nos quais se utilizam extratos brutos ou parasitas íntegros, porém não viáveis, como antígeno), em pacientes tratados, eram de reatividade cruzada com resíduos galactosyl α 1-3 galactose (gal α 1-3 gal). Estes anticorpos anti-gal estão naturalmente presentes no soro humano, já que este epitopo é observado em diferentes microrganismos, inclusive bactérias da flora intestinal normal. Krautz et al. (1994), avaliaram dois antígenos solúveis de tripomastigotas, o AgSb (que já havia sido avaliado por Gazzinelli et al. 1993) e um outro excretado/secretado por essas formas em meio de cultura (AgES), em teste de ELISA para o diagnóstico da infecção chagásica e controle de cura de pacientes tratados. Entre os indivíduos com infecção ativa, o AgSb e o AgES detectaram 93% e 100% dos casos, respectivamente. No entanto, entre os indivíduos tratados que apresentavam testes parasitológicos negativos, mas sorologia convencional positiva, os testes detectaram 28% e 5% dos casos, respectivamente. Os autores sugeriram a utilização do teste de ELISA empregando o AgSE, em substituição a reação de LMCo, no acompanhamento de pacientes submetidos à terapêutica específica. A principal vantagem do AgES em relação ao AgSb, era que o primeiro dispensa etapas de concentração e diálise na sua obtenção.

Umezawa et al. (1996), desenvolveram um teste de WB empregando antígenos excretados e secretados por formas tripomastigotas (TESA blot) coletados de sobrenadante de cultura de células, obtendo alta especificidade e sensibilidade com soros de pacientes com infecção crônica, aguda e congênita, desta forma, permitindo o diagnóstico diferencial entre a fase aguda e crônica.

Tambourgi et al. (1995), descreveram a utilização da GP 87-93 kDa ou T-DAF ("Trypanosoma- decay accelerating factor"), isolada de formas tripomastigotas, em teste de ELISA. O T-DAF ELISA apresentou 96% de sensibilidade e 100% de especificidade, mostrando ótimas perspectivas para seu emprego no diagnóstico da doença de Chagas.

Martins-Filho et al. (1995) descreveram um novo método de detecção de anticorpos que se ligam a antígenos de superfície de tripomastigotas, empregando a tecnologia de citometria de fluxo. Os tripomastigotas vivos são incubados com a amostra de soro do paciente e subsequentemente com uma anti-IgG humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína. A seguir, os parasitas são fixados e contados no citômetro. Com base nas experiências com o teste de LMCo, considerou-se que a eficácia do

tratamento era negativa se a percentagem dos tripomastigotas fluorescentes fosse maior que 20% (Martins-Filho et al. 1995).

Recentemente, com a introdução da quimioluminescência no diagnóstico de outras infecções, um grupo de pesquisadores (Almeida et al. 1997) vem aplicando esse teste com antígenos purificados (glicoconjugados de tripomastigotas, AT) no diagnóstico e na avaliação de efeito terapêutico na doença de Chagas.

Sem dúvida a utilização desses antígenos purificados elevou a especificidade das reações, porém, até o momento nenhum antígeno purificado foi empregado em testes comerciais. Geralmente, os antígenos específicos estão presentes em quantidades reduzidas e a dificuldade de se obter, através de processos de purificação, quantidade suficiente para uso em larga escala, torna-se um fator limitante.

4.3.3. Utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos:

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, abriu novos caminhos para se estudar a antigenicidade de moléculas de *T. cruzi*. O isolamento de antígenos recombinantes de *T. cruzi* a partir de bibliotecas de expressão com soros de animais infectados e pacientes chagásicos, tem sido obtido por diversos laboratórios (Ibañez, Affranchino & Frasch 1987, Affranchino et al. 1989, Levin et al. 1989, Lafaille et al. 1989, Hoft et al. 1989). A maioria destes antígenos são constituídos por repetições de aminoácidos que podem ser imunodominantes nas infecções naturais. As seqüências de aminoácidos das unidades de repetição são bastante conservadas entre as diferentes cepas do *T. cruzi*, o que pode contribuir para uma boa sensibilidade, quando estes antígenos são empregados em testes sorológicos. Os resultados obtidos têm indicado elevada especificidade, sem a ocorrência de reações cruzadas com soros de indivíduos infectados com leishmanioses visceral ou cutânea, ou pelo *T. rangeli*. No entanto, a heterogeneidade da resposta imune do hospedeiro e as diferenças antigênicas apresentadas pelas várias cepas do parasita, dão origem a uma sensibilidade limitada quando se utiliza um único antígeno. Portanto, o emprego de apenas um antígeno recombinante deixaria de diagnosticar alguns indivíduos chagásicos. Assim, tornou-se necessário à utilização de vários antígenos em um único

teste, na tentativa de melhorar a sua sensibilidade. Até o momento, vários antígenos recombinantes têm sido descritos e avaliados como reagentes em potencial para o diagnóstico, por diferentes laboratórios, através do desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos. (Zingales et al. 1990, Krieger et al. 1992, Lorca et al. 1992, Carvalho et al. 1993, Gruber & Zingales 1993, Paranhos et al. 1994, Pastini et al. 1994).

Ibañez et al. (1987) isolaram uma série de antígenos recombinantes de *T. cruzi* e alguns desses (1, 2, 13, 30, 36 e SAPA ["shed acute-phase antigen"]) reagiram com 66%, 67%, 39%, 49%, 34% e 10%, respectivamente, de soros de pacientes chagásicos crônicos, sendo 23 oriundos da Argentina, 49 do Brasil e 12 do Chile (Ibañez et al. 1988, Frasch e Reyes, 1990). Levin et al. (1989) identificaram cinco proteínas recombinantes (JL1, JL5, JL7, JL8 e JL 9) que eram reconhecidas por soros de indivíduos chagásicos das formas indeterminada e cardíaca, mas não eram reconhecidos por soros de indivíduos infectados por *L. brasiliensis*. Lafaille et al. (1989) selecionaram dois clones, denominados antígeno repetitivo citoplasmático (CRA) e antígeno repetitivo flagelar (FRA), cujos produtos eram altamente conservados em todas as cepas de *T. cruzi* testadas (Krieger et al. 1992). Quando ambos os antígenos recombinantes (CRA e FRA) foram usados simultaneamente no teste de ELISA, com um painel de 800 soros bem definidos, foram obtidas sensibilidade e especificidade de 100% (Almeida et al. 1990 e Krieger et al. 1992). Hoft et al. (1989) identificaram 8 proteínas recombinantes (TCR -1, -3, -27, -39, -61, -69, -70 e -101) que eram reconhecidas por soros de pacientes chagásicos. Zingales et al. (1990) descreveram dois polipeptídeos recombinantes (B-12 e B-13) de *T. cruzi* e os avaliaram pelo teste de radioimunoensaio (RIA). Posteriormente, Gruber & Zingales (1993) caracterizaram e avaliaram estes mesmos polipeptídeos pelos testes de ELISA e RIA, sendo o recombinante B-13 proposto para ser utilizado em diagnóstico. Cotrim et al. (1990) identificaram um antígeno recombinante H-49 que apresentou 100% de sensibilidade e especificidade pelo teste WB. Porém, Silveira et al. (1990) em outra avaliação observou 99% de especificidade e sensibilidade. Posteriormente, Paranhos et al. (1994) em uma nova análise do antígeno H-49, desta vez em teste de ELISA, observaram 84% de sensibilidade e 100% de especificidade. Cetron et al. (1992) avaliaram três antígenos recombinantes (F1-160, SA85-1.1 e SA85-1.2) pelo teste de ELISA direto e observaram uma alta especificidade mas a sensibilidade atingia níveis

máximos de somente 60%. Lorca et al. (1992) avaliaram a reatividade de oito antígenos recombinantes (1, 2, 13, 26, 30, 36, 54, e SAPA) descritos por Ibañez et al. (1987), empregando o teste de "dot-blot". Do total de soros de pacientes chagásicos crônicos testados, 95% reagiram com pelo menos um dos antígenos, sendo que os antígenos 1 e 2 apresentaram os melhores resultados (88%). A especificidade do teste não foi avaliada nesse estudo.

Godsel et al. (1995), desenvolveram um teste de ELISA empregando um antígeno recombinante relacionado a uma proteína de 24 kDa, o FcaBP ("flagellar calcium-binding protein"). Os autores obtiveram ótimos índices de sensibilidade e especificidade (100%) e propuseram sua utilização para triagem em bancos de sangue dos Estados Unidos. Krautz et al. (1995), avaliaram este mesmo antígeno recombinante para verificar a cura após tratamento específico para a doença de Chagas. Foram empregados os testes de ELISA e WB, e os resultados foram comparados ao teste de lise mediada pelo complemento (LMCo), havendo concordância total. Recentemente, Umezawa et al. (1999) avaliaram um teste de ELISA empregando separadamente seis antígenos recombinantes já descritos na literatura (H49, JL7, A13, B13, JL8 e IF8), com um painel de 541 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos residentes em nove países da América Latina (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras e Venezuela). A sensibilidade dos antígenos recombinantes variou de 87 a 99% e a especificidade de 96,2 a 99,6%. Os autores sugeriram a combinação de alguns desses antígenos para a padronização de um kit comercial a ser utilizado no diagnóstico de rotina. Este estudo mostra a importância de se avaliar um novo antígeno com populações diferentes, pois alguns desses antígenos recombinantes mostraram variações no seu desempenho nas diferentes populações analisadas nesta avaliação.

Nos últimos anos, peptídeos sintéticos derivados de seqüências repetitivas de aminoácidos das proteínas recombinantes, têm sido avaliados. Vergara et al. (1991), avaliaram cinco peptídeos sintéticos (contendo a seqüência dos antígenos 1, 2, 13, 36, SAPA) com 34 amostras de soros de pacientes chagásicos, em um teste imunorradiométrico (IRMA) e compararam os resultados com os dos testes de ELISA e IFI, empregando antígenos convencionais. Do total de amostras analisadas, 97% reagiram com pelo menos um dos peptídeos, sendo que houve melhor resposta com

o peptídeo 2 (91%) e a especificidade foi de 100% com todos peptídeos empregados. Os autores sugeriram a utilização de três peptídeos (2, 13 e 36) combinados para detecção de anticorpos para *T. cruzi* a fim de se obter o máximo de sensibilidade. Posteriormente, Vergara et al. (1992), empregando o teste ELISA com esses mesmos peptídeos, em 60 amostras de soros de pacientes chagásicos, observaram resultados similares, tendo o peptídeo 2 apresentado maior sensibilidade (93%). Burns et al. (1992), identificaram e sintetizaram um epítipo antigênico conservado entre vários isolados de *T. cruzi*, tendo sido denominado de TcD. O polipeptídeo é predominantemente expresso por tripomastigotas e a proteína nativa apresenta uma Mr de 260 KDa. Os peptídeos recombinante e sintético foram avaliados em testes de ELISA e apresentaram respectivamente 95,3% e 96,7% de sensibilidade e 93,4% e 96,7% de especificidade, sendo que, o peptídeo sintético reagiu com 8 de 9 soros na fase aguda. Peralta et al. (1994) avaliaram em um teste de ELISA, dois peptídeos sintéticos o TcD e o Pep2 (Ibañez et al. 1987, Vergara et al., 1991), tanto separadamente quanto em conjunto, com um painel de soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos residentes em uma área endêmica do Brasil. Para avaliar a especificidade foram utilizados soros de indivíduos com outras infecções, inclusive leishmaniose. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 93% para o ELISA –TcD e 91% para o ELISA-Pep2. O teste de ELISA usando uma mistura de ambos os peptídeos mostrou uma sensibilidade maior que 99% e não foram detectados resultados falsos positivos com soros de indivíduos com leishmaniose visceral e cutânea.

Recentemente, Rabello et al. (1999), avaliaram um novo teste comercial, o ID-Chagas-Particle Gel Immunoassay (ID-PaGIA Chagas) (Dia Med-Brasil). O reagente consiste de partículas de cor vermelha, onde estão aderidos três peptídeos sintéticos: Pep2, TcD (já descritos na literatura) e o TcE. A amostra de soro é misturada às partículas contendo os antígenos e, posteriormente, esta mistura é centrifugada sobre um matriz de gel. Se houver a presença de anticorpos específicos as partículas aglutinam e são retidas na superfície do gel e se não houver anticorpos específicos as partículas se depositam no fundo do tubo. A leitura é visual. O estudo foi executado, paralelamente, em quatro instituições diferentes com 230 amostras de soro e foram observados os seguintes resultados: sensibilidade variou de 95,7% a 97,4% e a especificidade variou de 93,8% a 98,8%. Houghton et al. (1999) avaliaram a utilização

de um ELISA tetrapeptídeo, empregando peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes e sugeriram sua padronização para uso em triagem de bancos de sangue. Inicialmente foi analisado um ELISA tripeptídeo (2/D/E) com os peptídeos sintéticos TcD, TcE e Pep2, utilizando 240 amostras de soro positivas (confirmadas por um teste de RIPA). Destas amostras apenas uma não apresentou reatividade, sendo esta então utilizada para identificação e obtenção de mais um antígeno recombinante (TcF) para compor um ELISA-tetrapeptídeo.

Nos últimos anos tem sido proposta a utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos adsorvidos à membranas de nitrocelulose e "nylon". Pastini et al. (1994), descreveram o desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático comercial DiaKit Bio Chagas Assay (Gador S.A), empregando antígenos recombinantes (1,2,13,30 e SAPA) descritos por Ibañez et al. (1987). Uma mistura dos antígenos foi adsorvida a uma pequena tira de membrana de nitrocelulose, reforçada com plástico, formando uma linha horizontal. Foram observados valores em torno de 99% de sensibilidade e especificidade. O teste mostrou bastante praticidade e facilidade de leitura, pois não é necessário nenhum equipamento. Uma nova configuração de teste imunoenzimático tem sido desenvolvida para o diagnóstico de doenças infecciosas, o Line Immunoassay (LIA). Trata-se de uma tira de membrana de "nylon" onde são adsorvidos antígenos sintéticos e/ou recombinantes separadamente, formando várias linhas. O teste proporciona uma análise de cada antígeno em relação à presença ou não de reatividade e da intensidade da reação, podendo-se montar um algoritmo para chegar a um diagnóstico confirmatório (Zrein et al. 1998).

Algumas vantagens da aplicação de peptídeos recombinantes e sintéticos em diagnóstico estão na facilidade de obtenção de quantidades razoáveis, na reprodutibilidade, na ausência de perigo de contaminação durante o manuseio da preparação antigênica, na ausência de reatividade cruzada com antígenos oriundos de organismos relacionados e na sua estabilidade. Portanto, a tentativa em aprimorar reagentes que possam contribuir efetivamente para a obtenção de testes sensíveis e específicos empregando tais reagentes, parece ser justificada pelos resultados favoráveis que vêm sendo obtidos.

5. Avaliação de kits comerciais

Durante os últimos anos, alguns kits de ELISA têm sido comercializados por diferentes empresas. Entretanto, poucos são os estudos que avaliaram estes reagentes. Ferreira et al. (1991) descreveram a padronização e avaliação de um teste de ELISA (BIO ELISA-cruzi). Foram testadas 1648 amostras de soro, sendo 219 de indivíduos com diagnóstico clínico de doença de Chagas e 104 com diagnóstico de outras infecções. O teste foi comparado com outros já bem padronizados (IFI-Imunocruzi e HAI-Hemacruzi) e comercializados pela mesma empresa (Biolab). A sensibilidade, a especificidade e o índice de concordância (com IFI e HAI) obtida neste teste foram de 99%. Foi observada reatividade cruzada com alguns soros de indivíduos com leishmaniose cutânea e visceral, o que já era esperado, pois o antígeno empregado foi um extrato total de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Pan et al. (1992) avaliaram um kit (Abbott Laboratories), utilizando 1300 amostras de soros de regiões diferentes da América Latina. Os autores relataram uma sensibilidade de 100% para amostras de soros de pacientes com xenodiagnóstico positivo. Entretanto, os valores de sensibilidade obtidos com os soros positivos na HAI e IFI variaram de 58,6% a 99,8%. Teixeira, Borges-Pereira & Peralta (1994) comparando kits comerciais de Elisa (Hemobio- Chagas- Embrabio e Biozima-Chagas-Biotica) com um ELISA "in house" (IM-UFRJ-Chagas) acharam sensibilidades de 100% e 99% e especificidade de 96% e 95%, respectivamente. Entretanto, neste estudo foi utilizado um painel de uma única área endêmica para a doença de Chagas. Carvalho et al. (1994) compararam um teste de ELISA em que foi utilizada uma mistura de dois antígenos recombinantes (CRA + FRA) e quatro kits comerciais de ELISA (Abbott Laboratories, Biolab-Mérieux, Gull Laboratories e Ortho Diagnostics). Para este estudo foram empregadas amostras de soro de indivíduos residentes em uma área endêmica para doença de Chagas (Minas Gerais - Brasil), comprovadamente chagásicos e não chagásicos e soros de indivíduos doadores de sangue. Entre estes últimos, alguns apresentavam resultados de sorologia conflitantes. Como testes de referência foram empregados os testes de IFI e HAI da Biolab. Os autores obtiveram uma sensibilidade variando de 99 a 100% e especificidade de 95 a 98%. Avaliações em relação a

aplicabilidade e reprodutibilidade de kits comerciais entre laboratórios também têm sido feitas (Lorca et al. 1994). Em um estudo mais recente, Hamschlak et al. (1997), também avaliaram três kits comerciais de ELISA (Abbott Chagas, Biolab-Merieux e Gull Laboratories). Para esta análise foram utilizadas 60 amostras de soro obtidas de doadores de sangue. Os autores definiram um método de análise combinada, em que uma amostra de soro era considerada positiva se pelo menos dois de três testes de ELISA e um teste de IFI confirmatório fossem positivos. Empregando os resultados dessa análise como padrão-ouro ("gold standard"), a sensibilidade dos testes de ELISA foram de 100% e a especificidade variou de 87 a 97%. Recentemente, foi desenvolvido um estudo multicêntrico coordenado pela COLAB (Coordenação de laboratórios) da Fundação Nacional da Saúde, para a avaliação dos conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta existentes no mercado, visando à recomendação daqueles com melhor desempenho (Sáez-Alquézar, et al. 1997). Neste estudo foram analisadas 87 amostras de soro por 5 laboratórios de referência, que receberam os 11 conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado na época. Após a análise dos resultados obtidos pelos 5 laboratórios, foram observados valores de sensibilidade variando de 44,2% a 96,1% e de especificidade variando de 90,3% a 100%, entre os 11 "kits".

A vasta literatura sobre a caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* tem mostrado que este apresenta uma considerável diversidade genética intra-específica. Portanto, diferentes cepas circulam em diferentes áreas endêmicas, ocorrendo uma variação de manifestações clínicas que podem, conseqüentemente, se refletir na resposta imune. Desta forma, fica claro a necessidade e a importância de se avaliar os diferentes kits comerciais com painéis de soros bem definidos e provenientes de diferentes áreas endêmicas.

Por outro lado, a detecção de resultados duvidosos (discordantes ou indeterminados) em testes sorológicos convencionais, tem estimulado o desenvolvimento de testes que apresentem uma maior especificidade. No entanto, até o momento não dispomos de nenhum teste comercializado que sirva de auxílio na confirmação desses casos duvidosos.

Portanto, tendo em vista a importância do diagnóstico da infecção chagásica e as dificuldades existentes, foram objetivos deste trabalho:

- Classificar painéis de soros obtidos de indivíduos residentes em quatro diferentes regiões do Brasil, onde a doença de Chagas é endêmica ou emergente, quanto à sua reatividade em testes sorológicos.
- Avaliar e comparar o desempenho de três kits comerciais, tipo ELISA, empregados rotineiramente na triagem de doadores de bancos de sangue, utilizando amostras de soros de indivíduos chagásicos ou não, residentes em diferentes regiões do Brasil.
- Avaliar o desempenho do teste imunoenzimático INNOLIA, que emprega peptídeos recombinantes e sintéticos como antígenos, como teste complementar ao diagnóstico da infecção chagásica.
- Determinar um algoritmo para interpretação do teste INNOLIA para o diagnóstico da infecção chagásica.

TRABALHO 1

Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease.

Oelemann WMR, Teixeira MGM, Verissimo da Costa GC, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR & Peralta JM

Journal of Clinical Microbiology, 36: 2423-2427, 1998

Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Chagas' Disease

WALTER M. R. OELEMANN,^{1*} MARIA DA GLÓRIA M. TEIXEIRA,¹ GIOVANI C. VERÍSSIMO DA COSTA,¹
JOSÉ BORGES-PEREIRA,² JOSÉ ADAIL F. DE CASTRO,³ JOSÉ RODRIGUES COURA,²
AND JOSÉ MAURO PERALTA¹

*Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro,¹ and Department of Tropical Medicine,
Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ,² Rio de Janeiro, and Department of Parasitology,
Federal University of Piauí, Teresina,³ Brazil*

Received 23 February 1998/Returned for modification 6 April 1998/Accepted 2 June 1998

Chagas' disease is a common cause of morbidity in Latin American countries. In Brazil, naturally occurring transmission of its etiologic agent, *Trypanosoma cruzi*, has been almost completely abolished through effective control programs aimed at the triatomid insect vector. Thus, transfusion of blood from infected donors has become the major route for contracting Chagas' disease due to the socioeconomically motivated migration of residents from areas where the disease is endemic to the larger urban centers. Therefore, the employment of screening tests is mandatory for all blood banks throughout the country. We compared the diagnostic performances of three commercially available screening assays used in routine testing in Brazilian blood banks: the Abbott Chagas antibody enzyme immunoassay (Abbott Laboratórios do Brasil, São Paulo), the BIOELISA-CRUZI kit (Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brazil), and the BIOZIMA Chagas kit (Polychaco S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). The evaluation was performed with sera obtained from chagasic patients and healthy residents of four different areas in Brazil where Chagas' disease is either endemic or emergent and where clinical manifestations of the disease and circulating parasite strains vary. The results obtained with each kit were compared to matched in-house enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay data obtained for each sample. Depending on the area under investigation, the three commercial kits produced specificity values between 93.3 and 100.0%, sensitivity values between 97.7 and 100%, and accuracies ranging from 93.6 to 100.0%.

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, which is endemic throughout Latin America and which is a major cause of morbidity and death in the affected countries. According to World Health Organization estimates (31), 16 to 18 million people are infected by the parasite and about 50,000 chagasic patients die each year from the disease. In Brazil, the area in which the disease is endemic extends over 17 states in the northeastern, southeastern, southern, and central western regions (21), but successful vector control programs have abolished almost completely the natural transmission of *T. cruzi* by its reduviid insect vector. Recent studies reported few chagasic patients younger than 12 years in the state of Minas Gerais (8, 20). Apart from vectorial transmission, Chagas' disease can be contracted either orally (39), congenitally (23), or by transfusion of blood from an infected donor (38). Due to socioeconomic factors, the migration of infected people from the areas in which the disease is endemic to the urban centers is very frequent, and blood transfusion has become the principal way of infection, accounting for an estimated 20,000 new cases per year in Brazil, a country with five to six million blood transfusions per year (21). Therefore, efficient donor screening is very important in order to identify and discard contaminated blood without negatively affecting the country's blood supply.

T. cruzi infection is lifelong, and after a short and mostly asymptomatic acute phase, during which the parasites can be detected in blood smears, patients enter the indeterminate

phase of the disease, which is marked by an extremely low parasitemia and no sequelae. This stage can last for 10 to 30 years, after which a significant percentage of patients develop the chronic manifestations of Chagas' disease (cardiopathy, megacolon, and/or megaesophagus). While traditional methods of parasite detection (hemoculture and xenodiagnosis) are time-consuming and of low sensitivity, PCR amplification of nuclear (32, 40) or kinetoplast (3, 43) DNA was shown to be very sensitive (10, 46). However, at present, PCR is not feasible for blood bank screening, and the best way of diagnosing an indeterminate or chronic *T. cruzi* infection is the serologic detection of antibodies directed against the parasite. Serologic assays include the indirect immunofluorescence assay (IFA), indirect hemagglutination, complement fixation, the radioimmunoprecipitation assay, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blots. Antigen preparations employed in these tests range from crude parasite extracts and subcellular fractions to cloned antigens and synthetic peptides (24, 27-30, 34-36, 41, 44, 45). Some of these tests are available commercially, while others are in-house assays being used only in research settings. In Brazilian blood banks today, the screening of donors for Chagas' disease by at least two tests based on different methodologies is obligatory. Although IFAs and hemagglutination often lead to false-positive or -negative test results due to subjective interpretation, both assays are still widely used in blood bank screening and epidemiological surveys, and the results are generally confirmed by an ELISA.

T. cruzi is polymorphic, and different parasite strains circulate in different areas (21). While to date no definite correlation between infecting strain and clinical manifestation has been demonstrated, survey studies in regions in which the

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ-CCS, Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro, Brazil. Phone: 0055-21-270 0990. Fax: 0055-21-560 8028. E-mail: IMIMWAL@MICROBIO.UFRJ.BR.

TABLE 1. Consensus classifications of sera from four regions of Brazil by in-house ELISAs and IFAs

Source of sera	No. of sera collected	No. of sera classified as:			
		Positive by both assays	Negative by both assays	Positive or negative	Discrepant (assay results differed)
Minas Gerais	261	180	81	261	0
Paraíba	466	135	305	440	26
Piauí	253	202	44	246	7
Amazon	85	3	75	78	7
Total	1,065	520	505	1,025	40

disease is endemic show differences in antibody titers found in the patients and in the degree of the clinical manifestations in the chronic phase of the disease (21). Since the infected donor populations encountered in the large urban centers of Brazil migrated from many different regions of the country in which the disease is endemic, in this study, we compared the performances of three commercial enzyme immunoassays (EIAs) by using panels of sera obtained from patients and healthy residents of four Brazilian areas where Chagas' disease is either endemic or emergent.

MATERIALS AND METHODS

Study population and description of areas in which Chagas' disease is endemic. Sera were obtained from patients and healthy residents from the following areas: the state of Minas Gerais in the south-central region of Brazil (municipality of Virgem da Lapa, $n = 261$; 12.6% seroprevalence), where the cardiac and digestive forms of the disease are common (4, 5); the hinterlands of the northeastern states of Paraíba ($n = 466$; 9.5% seroprevalence) and Piauí ($n = 253$; 5.9% seroprevalence), where the indeterminate form of the disease is common (7, 16, 17); and the Amazon state in the north of Brazil (municipality of Barcellos, $n = 85$; 13.2% seroprevalence), where Chagas' disease is emergent (15, 18, 19).

The municipalities and regions situated in the states of Minas Gerais, Paraíba, and Piauí are part of the dry hinterlands with sparse vegetation and rainless periods lasting from 1 to 3 years. On the other hand, the study area located in the

Amazon state is part of the rain forest. The chagasic patients in the areas under investigation became infected mainly by vectorial transmission, with the predominant vectors being the triatomid bugs *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans* (Minas Gerais) (6), *Triatoma brasiliensis* (Paraíba and Piauí) (16), *Triatoma pseudomaculata* (Paraíba) (16), and *Rhodnius brethesi* (Amazon) (19). Professional occupations in these regions are agriculture and stock raising (Minas Gerais, Paraíba, and Piauí) and gathering of palm fibers (Amazon). Illiteracy reaches levels between 30 and 40%. Most members of the study population were less than 30 years or more than 50 years of age. The intermediate age group (30 to 50 years old) is underrepresented in these areas as a consequence of the migration to the cities of Manaus, Salvador, São Paulo, and Rio de Janeiro.

Indirect immunofluorescence. All sera were tested at a final dilution of 1:40 in in-house tests according to the method of Camargo (12) with *T. cruzi* Y epimastigotes as antigen and fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin G (IgG) (Cappel Biomedical Inc., Malvern, Pa.).

In-house ELISA. The cytosolic fraction of *T. cruzi* Y epimastigotes was used as antigen. Briefly, Nunc microtiter plates were sensitized overnight at 4°C with 100 µl of antigen solution in 0.05 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) at a concentration of 200 ng/ml. Sera were diluted 1/200 in phosphate-buffered saline-Tween 20 (PBST) (0.3%)–fetal calf serum (5.0%), and 100 µl of the mixture was added to the wells. After 30 min at 37°C, the plates were washed eight times with PBST, anti-human IgG-peroxidase conjugate (Cappel Biomedical Inc.) was added to the wells at a dilution of 1/10,000 in PBST-fetal calf serum, and the wells were incubated at 37°C for 30 min. After eight additional washes, the immune complexes were developed with tetramethylbenzidine-H₂O₂ (Sigma), and the absorbances were read at 450 nm. Cutoff values were calculated by dividing the difference of the average absorbances of two positive and three negative controls by three.

To compare the results of ELISAs performed on different days, the results were expressed as ratios by dividing the absorbance values of each plate by the cutoff value obtained for the same plate. A sample was considered positive if the ratio was equal to or greater than 1.1, negative if the ratio was equal to or smaller than 0.9, and indeterminate if the ratio was between 0.9 and 1.1. After the results of the in-house ELISA were compared to those previously obtained by IFA, the sera were classified as either positive, negative, or discrepant. Sera with repeatedly indeterminate ELISA results were a priori considered discrepant. The results are shown in Table 1.

Commercial EIAs. Three commercial EIAs were evaluated in this study: the Abbott Chagas antibody EIA (Abbott Laboratórios do Brasil, São Paulo), the BIOELISACRUZI kit (Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brazil), and the BIOZIMA Chagas kit (Polychaco S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). Each EIA was carried out strictly according to the instructions provided by the manufacturer. Calculations of the cutoff values and evaluation of the test results were performed as described in the respective sections of each manual.

TABLE 2. Comparison of results for sera from four regions of Brazil obtained by IFAs and in-house assays with results obtained with three commercial assay kits

Source of sera and result	Tested by IFAs and in-house assays	No. of serum samples:									
		With Abbott Chagas antibody EIA kit result			With Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit result			With BIOZIMA Chagas kit result			
		Positive	Negative	Indeterminate	Positive	Negative	Indeterminate	Positive	Negative	Indeterminate	
Minas Gerais											
Positive	180	179	0	1	178	1	1	180	0	0	
Negative	81	2	79	0	1	80	0	1	80	0	
Paraíba											
Positive	135	133	2	0	126	3	6	135	0	0	
Negative	305	12	287	6	0	305	0	20	285	0	
Piauí											
Positive	202	199	3	0	196	3	3	202	0	0	
Negative	44	2	41	1	0	43	1	1	43	0	
Amazon											
Positive	3	3	0	0	3	0	0	3	0	0	
Negative	75	0	74	1	0	75	0	5	70	0	
Total for all sera											
Positive	520	514	5	1	503	7	10	520	0	0	
Negative	505	16	481	8	1	503	1	27	478	0	

TABLE 3. Diagnostic performance of three assay kits with sera from four regions of Brazil^a

Source of sera	Performance (%) by assay type								
	Abbott Chagas antibody EIA			Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit			BIOZIMA Chagas kit		
	Relative sensitivity	Relative specificity	Accuracy	Relative sensitivity	Relative specificity	Accuracy	Relative sensitivity	Relative specificity	Accuracy
Minas Gerais	100.0	97.5	99.2	99.4	98.8	99.2	100.0	98.8	99.6
Paraíba	98.5	96.0	96.8	97.7	100.0	99.3	100.0	93.4	95.5
Piauí	98.5	95.3	98.0	98.5	100.0	98.8	100.0	97.7	99.6
Amazon	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	93.3	93.6
Total for all sera	99.0	96.8	97.9	98.6	99.8	99.2	100.0	94.7	97.4

^a Indeterminate results have been omitted.

RESULTS

Evaluation of the EIAs. The results of the evaluation of the three kits are presented in Tables 2 and 3 for each study area and for the study population as a whole. Due to the lack of a serologic "gold standard" for the indeterminate and chronic phases of Chagas' disease (see also Discussion), the sera employed in the evaluation were characterized by matched IFA and in-house ELISA results. Of a total of 1,025 sera, 520 were consensus positive and 505 were consensus negative. Performances of the commercial tests were expressed as relative sensitivity, relative specificity, and accuracy (11).

Looking at the results obtained for each study area and for the population as a whole, all three kits performed comparably (Table 3). Considering the entire study population, the BIOELISACRUZI kit had the highest relative specificity and was the most accurate test, whereas the BIOZIMA Chagas kit showed the highest relative sensitivity.

With respect to the IFA and in-house ELISA consensus classifications, 63 sera of a total of 1,025 (6.1%) gave either a discrepant or indeterminate result with at least one of the kits evaluated in this study (some of the 76 discordant results shown in Table 2 appeared in the same sample). Due to the lack of a gray-zone definition for the BIOZIMA Chagas kit, indeterminate results were observed only for the Abbott Chagas antibody EIA (9 of 1,025; 0.9%) and the Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit (11 of 1,025; 1.1%).

One of the four sera that tested indeterminate with the BIOELISACRUZI kit was a consensus-negative serum from Piauí that tested positive with the two other kits. The remaining 10 sera (1 from Minas Gerais, 6 from Paraíba, and 3 from Piauí) were consensus positive and were classified as such by both the Abbott Chagas antibody EIA and BIOZIMA Chagas kit.

On the other hand, the BIOELISACRUZI kit diagnoses were in agreement with the consensus on all nine sera which gave indeterminate results with the Abbott Chagas antibody EIA (six sera from Paraíba and one each from Minas Gerais, Piauí, and Amazon), whereas the BIOZIMA Chagas kit classified as positive three consensus-negative sera of the six from Paraíba.

The BIOELISACRUZI kit showed the highest relative specificity, with only 1 of 505 (0.02%; from the panel of Minas Gerais sera) consensus-negative sera diagnosed as positive. This serum was classified as negative by the two other kits. The Abbott Chagas antibody EIA and the BIOZIMA Chagas kit showed much lower relative specificities, with 16 (3.2%) and 27 (5.3%) positive results for consensus-negative sera, respectively. From the 16 consensus-negative sera that were positive in the Abbott test, 12 (75%) were from the Paraíba panel and

2 each were from Minas Gerais and Piauí. Six of these Paraíba sera and one of the Piauí sera also tested positive with the BIOZIMA Chagas kit. Additionally, the latter test gave positive results with another group of 20 consensus-negative sera (14 from Paraíba, 5 from the Amazon, and 1 from Minas Gerais), which were all diagnosed as negative by the Abbott and Biolab-Mérieux EIAs.

The BIOZIMA Chagas EIA did not yield any negative result for consensus-positive sera and, therefore, was the most sensitive test in this study. On the other hand, the Abbott Chagas antibody EIA gave negative results for five (1.0%) consensus-positive sera, three of which were from Piauí and two of which were from Paraíba. The BIOELISACRUZI kit yielded negative results for seven (1.3%) consensus-positive sera. Of these, three sera were from Piauí, three sera were from Paraíba, and one serum was from Minas Gerais. Two of the three sera from Piauí also tested negative in the Abbott Chagas antibody EIA. However, the remaining five sera were classified as positive by the other two tests. Taken together, these results clearly indicate that sera from patients residing in the states of Paraíba and Piauí have to be considered problematic for routine serology testing (see also Discussion).

DISCUSSION

In the present study, we compared the performances of the Abbott Chagas antibody EIA, the Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit, and the BIOZIMA Chagas kit, which are routinely employed in Brazilian blood banks for the detection of antibodies against *T. cruzi*.

The BIOZIMA Chagas and BIOELISACRUZI kits are 96-well ELISAs, while the Abbott Chagas antibody EIA employs coated beads as the solid matrix. The Brazilian prices (in U.S. dollars) for a single test are \$2.17, \$1.59, and \$3.51, respectively. The total test incubation times varied from 50 to 120 min, with the BIOZIMA Chagas kit being the fastest, providing a result by visual reading after a little over 1 h. In addition, it was the most easily performed, with controls, conjugate, and substrate supplied in dropper bottles as ready-to-use solutions.

All three assays gave satisfactory results with sera which were obtained in four Brazilian areas and classified as either consensus positive or negative by matched in-house IFA and in-house ELISA results. Relative assay sensitivities and specificities varied depending on the area under investigation (Table 3) and ranged for the total population from 98.6 to 100% and 94.7 to 99.8%, respectively. The observed area-dependent differences may in part be attributed to the disproportional fractions of positive and negative sera obtained in each area (e.g., 3 positive versus 75 negative sera from the Amazon and 202 positive versus 44 negative sera from Piauí [Table 2]).

However, for the total population, we employed 520 (50.7%) consensus-positive and 505 (49.3%) consensus-negative sera. Consequently, assay performances calculated for the four panels as a whole should reflect interassay differences more precisely.

The ELISAs yielded conflicting results for a number of sera, but the same sera were not necessarily problematic for each of the three kits evaluated in this study. Thus, for 21 of 520 (4.0%) positive and 42 of 505 (8.3%) negative sera, the results obtained with at least one of the three kits were not in agreement with the consensus. These findings corroborate the results obtained by others (1, 26). A chemiluminescent ELISA for the diagnosis of active infection by *T. cruzi* (1) was evaluated with sera which yielded inconclusive results in eight conventional serologic tests. Depending on the combination of test results, the percentage of inconclusive results varied between 18 and 78%. In another study (26), the Abbott Chagas antibody EIA, the Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit, and the Chagas IgG ELISA (Gull Laboratories, Salt Lake City, Utah) were evaluated with 60 sera obtained at a blood bank. The authors defined a combined assay performance in which a serum was considered positive if at least two of the three ELISAs to be evaluated plus a confirmatory IFA were positive. Using the combined assay performance results as the gold standard, ELISA sensitivities were reported to be 100% and specificities varied from 87 to 97%. Carvalho et al. (13) compared the performances of an in-house recombinant-antigen ELISA and four commercial ELISAs (Abbott, Biolab-Mérieux, Gull Laboratories, and Ortho Diagnostic, Buenos Aires, Argentina) with sera obtained in Virgem da Lapa, Minas Gerais, and at the state blood bank of São Paulo. The authors report for the commercial tests specificities ranging from 95.0 to 98.0% and sensitivities from 99.0 to 100.0%.

The observed variation of sera that were problematic for a given assay is not surprising since the antigen preparations employed in each of the evaluated kits are obtained by different procedures. Furthermore, the *T. cruzi* Y epimastigotes are cultivated according to different protocols in various culture media. As previously reported (37), extraction procedures influence drastically the epitopes retained on antigenic molecules. Furthermore, binding of these molecules to solid surfaces hides or exposes epitopes that have different affinities for both specific and nonspecific antibodies present in the sera, thus accounting for conflicting results.

The Abbott Chagas antibody EIA was also evaluated in two studies published earlier (9, 33). Pan et al. (33) reported a sensitivity of 93.48% and a specificity of 99.48% with 1,392 sera from Brazil and Argentina which had been previously characterized by a commercial indirect hemagglutination assay.

Brashear et al. (9) used the Abbott Chagas antibody EIA to screen 13,309 sera from a potentially high-risk U.S. donor population and calculated a specificity of 99.98% and positive and negative predictive values of 81.25 and 99.99%, respectively.

The sera employed in our study were obtained in Minas Gerais, Paraíba, Piauí, and the Amazon, regions where disease manifestation, circulating parasite strains, and parasitemia vary (6, 7, 16, 18, 19). As a consequence of the sampling technique, in which houses and dwellings were first investigated for the presence of triatomid bugs and then, in a second step, blood samples were drawn from the residents and their neighbors (Minas Gerais, Piauí, and Paraíba), the panels we used did not reflect the overall prevalences of *T. cruzi* infection described in serologic surveys for the populations in the study areas. However, in the Amazon region, triatomid bugs are not found in houses, and people get infected while working in the rain forest.

The Amazon panel utilized in this study consists of a small part of the samples obtained during the serologic survey (19).

In the particular case of Chagas' disease, no serologic gold standard for the definition of the disease status exists, since detection of *T. cruzi*-specific antibodies depends on the patient's immune status and since cross-reactivity of *T. cruzi* antigens with antibodies raised against other coendemic parasites (*Leishmania* and *Trypanosoma rangeli*) is frequent (2, 25, 42). Nevertheless, despite its drawbacks, IFA is the most commonly used serologic test for Chagas' disease and, as a result, is widely accepted as the gold standard (22). Therefore, as a first step we determined the status of the sera according to the results obtained in an in-house IFA and an in-house ELISA (Table 1). The sera were considered either positive or negative if IFA and ELISA results were concordant and indeterminate if the two results were discrepant. However, while no indeterminate serum was found in the panel from Minas Gerais, 26 (5.6%) of the 466 sera from Paraíba were found to be indeterminate, as were 7 (2.8%) of the 253 sera from Piauí and 7 (8.2%) of the 85 sera from the Amazon. These findings can be explained by the epidemiological characteristics and circulating parasite strains in the different areas. In Virgem da Lapa, Minas Gerais, the cardiac and digestive forms of Chagas' disease are frequent, and the circulating *T. cruzi* strains generally cause a high-titer immune response in the patients (6). Furthermore, this area is not one in which *Leishmania* spp. (5), which can cause false-positive results in Chagas' disease serology (14), is endemic. On the other hand, in the states of Paraíba and Piauí, the indeterminate form of the disease predominates, and patients show mostly moderate or weak immune responses to the infection (7). Also, in these areas leishmaniasis is frequent. As far as the Amazon is concerned, cross-reactions with *Leishmania* spp. may account for the high seroprevalence reported for this region (15, 19), and infections with the nonpathogenic parasite *T. rangeli* have been demonstrated (18). Taken together, these facts are likely to account for the indeterminate classification of some sera by our in-house tests. In addition, we cannot rule out the possibility that some of the discrepancies observed between the in-house consensus results and those obtained with the three kits were due to a misclassification of the sera by our in-house assays. However, the use of in-house tests for the characterization of serum panels and subsequent evaluation of a commercial kit has been reported by others (35).

This study shows that the Abbott Chagas antibody EIA, the Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit, and the BIOZIMA Chagas test are well suited for the detection of IgG antibodies against *T. cruzi*. Nevertheless, when used for routine diagnoses and blood bank screening, problems can occur if the patients or donors come from areas in which the epidemiology of Chagas' disease is complex. Therefore, confirmatory tests with higher specificities need to be developed, and good candidates for such tests are those that include a combination of *T. cruzi*-specific cloned antigens and/or synthetic peptides (13, 28, 35, 36).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho de Ensino para Graduados de Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG-UFRJ).

We are deeply indebted to Carmen Nogueira from the blood bank of the University Hospital Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brazil, for permission to use the Commander Dynamic Incubator and Quantum II reader with the Abbott Chagas antibody EIA and to Carlos A. B. de Souza for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Almeida, I. C., D. T. Covas, L. M. T. Soussumi, and L. R. Travassos. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 37:850-857.
- Araujo, F. G. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infect. Immun.* 53:179-185.
- Avila, H. A., D. S. Sigman, L. M. Cohen, R. C. Millikan, and L. Simpson. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48:211-222.
- Borges-Pereira, J. 1997. Doença de Chagas humana: estudo da infecção crônica, morbidade e mortalidade em Virgem da Lapa, MG, Brasil (1976-1996). Ph.D. thesis. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Borges-Pereira, J. 1998. Personal communication.
- Borges-Pereira, J., and J. R. Coura. 1986. Morbidade da doença de Chagas. Estudo seccional em uma área endêmica. Virgem da Lapa, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 19:139-148.
- Borges-Pereira, J., and J. R. Coura. 1987. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do Sertão da Paraíba. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20:101-107.
- Borges-Pereira, J., R. C. R. Santos, E. R. S. Lemos, M. L.-S. Cruz, C. E. A. Subia, H. P. F. Willcox, and R. V. Cunha. 1989. Infecção chagásica em menores de treze anos no município de Virgem da Lapa, Minas Gerais. Estudo longitudinal no período de seis anos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22(Suppl. II):124.
- Brashear, R. J., M. A. Winkler, J. D. Schur, H. Lee, J. D. Borezak, H. J. Hall, and A. A. Pan. 1995. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in the southwestern and western United States. I. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. *Transfusion* 35:213-218.
- Britto, C., M. A. Cardoso, C. M. Monteiro Vanni, A. Hasslocher-Moreno, S. S. Xavier, W. Oelemann, A. Santoro, C. Pirmez, C. M. Morel, and P. Wincker. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110:241-247.
- Buck, A. A., and J. J. Gart. 1966. Comparison of screening tests and reference tests in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Am. J. Epidemiol.* 83:586-592.
- Camargo, M. E. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8:227-234.
- Carvalho, M. R., M. A. Krieger, E. C. Almeida, W. Oelemann, M. A. Shikanai-Yasuda, A. W. Ferreira, J. Borges-Pereira, A. Sôez-Alquizar, P. E. Dorthiac-Llacer, D. F. Chamone, and S. Goldenberg. 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33:830-834.
- Chiller, T. M., M. A. Samudio, and G. Zouler. 1990. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:650-656.
- Coura, J. R., T. V. Barrett, and M. A. Naranjo. 1994. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27:251-253.
- Coura, J. R., J. Borges-Pereira, F. L. Alves Filho, J. A. F. de Castro, R. V. da Cunha, W. Costa, and A. C. V. Junqueira. 1996. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29:197-205.
- Coura, J. R., L. L. de Abreu, L. E. G. Dubois, F. C. Lima, E. de Arruda, Jr., H. P. F. Willcox, N. Annunziato, and W. Petana. 1984. Morbidade da doença de Chagas. II. Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:101-124.
- Coura, J. R., O. Fernandes, M. Arboleda, T. V. Barrett, N. Carrara, W. Degraive, and D. Campbell. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:278-279.
- Coura, J. R., H. P. F. Willcox, M. Arboleda Naranjo, O. Fernandes, and D. D. de Paiva. 1995. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study (I). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37:415-420.
- Dias, J. C. P. 1987. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitol. Today* 3:336-341.
- Dias, J. C. P. 1992. Epidemiology of Chagas' disease, p. 49-80. In S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo, and A. Rassi (ed.), Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. International Society of Blood Transfusion, São Paulo, Brazil.
- Ferreira, A. W., and S. L. Moraes de Avila. 1995. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. *São Paulo Med. J. RPM* 113:767-771.
- Freilij, H., and J. Altheb. 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21:551-555.
- Godsel, L. M., R. S. Tibbetts, C. L. Olson, B. M. Chaudoir, and D. M. Engman. 1995. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Clin. Microbiol.* 33:2082-2085.
- Guhl, F., L. Hudson, C. J. Marinkelle, C. A. Jaramillo, and D. Bridge. 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94:475-484.
- Hamerschlak, N., J. Pasternak, V. Amato Neto, M. B. de Carvalho, C. S. Guerra, A. L. Coscina, O. C. Ferreira, J. Rosenblit, and L. N. Sztterling. 1997. Chagas' disease: an algorithm for donor screening and positive donor counseling. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30:205-209.
- Knecher, L. M., L. F. Rojkin, G. A. Capriotti, and L. E. Lorenzo. 1993. Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int. J. Parasitol.* 24:207-211.
- Krieger, M. A., E. C. Almeida, W. Oelemann, J. J. Lafaille, J. Borges-Pereira, H. Krieger, M. R. Carvalho, and S. Goldenberg. 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:427-434.
- Levin, M. J., J. F. da Silveira, A. C. C. Frasc, M. E. Camargo, S. Lafon, W. M. Degraive, and R. Rangel-Aldão. 1991. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol. Immunol.* 89:11-20.
- Mendes, R. P., S. Hoshino-Shimizu, A. M. M. da Silva, I. Mota, R. A. G. Heredia, A. O. Luquetti, and P. G. Leser. 1997. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1829-1834.
- Noncayao, A. 1993. Chagas' disease, p. 62-75. In Tropical disease research: eleventh programme report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Moser, D. R., L. V. Kirchhoff, and J. E. Donelson. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:1477-1482.
- Pan, A. A., G. B. Rosenberg, M. K. Hurley, G. J. H. Schock, V. P. Chu, and A. Aiyappa. 1992. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J. Infect. Dis.* 165:585-588.
- Paranhos-Bacalla, G. S., M. R. M. Santos, P. C. Cotrim, A. Rassi, M. Jolivet, M. E. Camargo, and J. F. da Silveira. 1994. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol.* 16:165-169.
- Pastini, A. C., S. R. Iglesias, V. C. Carricarte, M. E. Guerin, D. O. Sánchez, and A. C. C. Frasc. 1994. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. *Clin. Chem.* 40:1893-1894.
- Peralta, J. M., M. D. G. M. Teixeira, W. G. Shreffler, J. B. Pereira, J. M. Burns, Jr., P. R. Sleath, and S. G. Reed. 1994. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Microbiol.* 32:971-974.
- Schechter, M., and N. Nogueira. 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29:37-46.
- Schmunis, G. A. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31:547-557.
- Shikanai-Yasuda, M. A., C. Brisola Marcondes, L. A. Guedes, G. S. Siqueira, A. A. Barone, J. C. P. Dias, V. Amato Neto, J. E. Tolezano, B. A. Peres, E. R. Arruda, Jr., M. H. Lopes, M. Shiroma, and E. Chapadeiro. 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 33:351-357.
- Silber, A. M., J. Büu, B. M. Porcel, E. L. Segura, and A. M. Ruiz. 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp. Parasitol.* 85:225-232.
- Solana, M. E., A. M. Katzin, E. S. Umezawa, and C. S. Miatello. 1995. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 33:1456-1460.
- Sousa, O. E., and J. M. Johnson. 1973. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22:18-23.
- Sturm, N. R., W. Degraive, C. M. Morel, and L. Simpson. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in the diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:205-214.
- Teixeira, M. G. M., J. Borges-Pereira, E. Natizert, M. L. N. X. Souza, and J. M. Peralta. 1994. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop. Med. Parasitol.* 45:308-312.
- Vergara, U., C. Veloso, A. Gonzalez, and M. Lucea. 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:39-43.
- Wincker, P., C. Britto, J. Borges-Pereira, M. A. Cardoso, W. Oelemann, and C. M. Morel. 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.

TRABALHO 2

A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease.

Oelemann WMR, Vanderborght BOM, Verissimo da Costa GC, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Castro JAF, Coura JR, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M & Peralta JM

Transfusion 39: 711-717, 1999

A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease

W.M.R. Oelemann, B.O.M. Vanderborght, G.C. Verissimo Da Costa, M.G.M. Teixeira, J. Borges-Pereira, J.A.F. De Castro, J.R. Coura, E. Stoops, F. Hulstaert, M. Zrein, and J.M. Peralta

BACKGROUND: The transfusion of contaminated blood has become the major route of transmission for Chagas' disease in Brazil. Current screening tests are insensitive and yield conflicting results, while confirmatory assays do not exist. A line immunoassay (INNO-LIA Chagas Ab [INNO-LIA]) combining relevant, immunodominant recombinant and synthetic antigens on a single nylon membrane strip was evaluated for the serologic confirmation of Chagas' disease.

STUDY DESIGN AND METHODS: Sera from 1062 patients and healthy residents of four Brazilian regions endemic for Chagas' disease were used for test optimization. The established confirmation algorithm was evaluated with an independent set of positive ($n = 75$) and negative ($n = 148$) samples.

RESULTS: In the optimization phase, without an established comparative gold standard, the results with the INNO-LIA were compared with those obtained in four other screening assays. In the validation phase, the INNO-LIA showed a sensitivity of 100 percent (95% CI, 95.21-100) and a specificity of 99.32 percent (95% CI, 96.29-99.98) for well-characterized sera. Moreover, its specificity reached 100 percent with a set of 40 sera obtained from patients with documented leishmaniasis. The interpretation criteria defined in this study indicated that the INNO-LIA accurately detected the presence of antibodies to various specific antigens of *Trypanosoma cruzi*.

CONCLUSION: The INNO-LIA Chagas Ab assay may become the first commercial assay to reliably confirm the presence of antibodies to *T. cruzi*.

Chagas' disease is endemic throughout Latin America and is a major cause of morbidity and mortality in those countries affected. Approximately 16 to 18 million people are infected, and about 50,000 patients die each year from the condition.¹ Its etiologic agent, the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is naturally transmitted by various species of triatomine bugs. Disease transmission occurs when infectious forms of the parasite are deposited during the blood meal along with the insect's feces. In Brazil, successful vector control programs have almost completely abolished naturally occurring transmission, except in the hinterlands. As a result, the transfusion of blood from infected donors—often migrants to larger cities—has become the major route for contracting the parasite.² Recent surveys estimate the annual number of transfusion-acquired Chagas' disease cases in Brazil at 20,000 out of a total of 5 to 6 million blood transfusions.³ Consequently, an efficient donor-screening program

ABBREVIATIONS: ELA(s) = enzyme immunoassay(s); ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IFA = indirect immunofluorescence assay; PCR = polymerase chain reaction.

From the Institute of Microbiology and the Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro; and the Department of Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; the Department of Parasitology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil; and Innogenetics N.V., Ghent, Belgium.

Address reprint requests to: Walter M.R. Oelemann, PhD, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ-CCS, Ilha do Fundão, 21941-900 Rio de Janeiro, Brazil; e-mail: IMINWAL@MICROBIO.UFRJ.BR.

Supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho de Ensino para Graduados de UFRJ (CEPG-UFRJ).

Received for publication May 18, 1998; revision received December 8, 1998, and accepted December 12, 1998.

TRANSFUSION 1999;39:711-717.

is crucial for eliminating contaminated blood while not negatively affecting the country's blood supply.

In Brazilian blood banks, the screening for antibodies directed against *T. cruzi* is mandatory. Screening assays include the indirect immunofluorescence assay (IFA), the indirect hemagglutination assay (IHA), and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The utilization of at least two assays based on different methods or different antigen preparations is currently recommended, but conflicting results are often observed. A few specialized laboratories have developed Western blot⁴ and radioimmuno-precipitation³ assays in an attempt to resolve discrepant results, but no single test is sufficiently sensitive to prevent transfusion transmission of Chagas' disease.

Most of the tests that are commercially available today in Brazil employ crude parasite extracts or subcellular fractions as antigen preparations. In recent years, various investigators have characterized *T. cruzi*-specific immunoreactive antigens, and several studies have evaluated the diagnostic potential of these antigens either in the form of recombinant proteins or as synthetic peptides.⁶⁻¹⁹ General conclusions that can be drawn from the published results are that 1) recombinant antigens are more specific than parasite extracts, which can cross-react with sera from patients harboring other diseases such as leishmaniasis, *Trypanosoma rangeli* infection, syphilis, or rheumatic fever; 2) sensitivities reported for the different recombinant antigens vary with the clinical status of the patient and the manifestation of the disease; and 3) the combined use of various recombinant antigens in the same test improves diagnostic sensitivity. On the basis of these results, we evaluated the use of a new assay combining relevant, immunodominant recombinant and synthetic antigens derived from *T. cruzi* proteins as a confirmatory diagnostic test for Chagas' disease.

MATERIALS AND METHODS

Study populations

The 1062 sera employed in this retrospective study for test optimization were obtained from patients and healthy residents of four Brazilian regions endemic for Chagas' disease: 261 sera were from the state of Minas Gerais (municipality of Virgem da Lapa), where the cardiac and digestive forms of the disease are frequent; 465 and 253 sera were obtained in the rural areas of Paraíba and Piauí, respectively, where the indeterminate form of the disease is common; and 83 sera were from the Amazon River basin (municipality of Barcellos), where Chagas' disease is emerging. Most of the blood samples originated from patients who have been participating in long-term follow-up studies for 2 to 20 years.²⁰⁻²⁶ Serologic analysis was performed by several immunologic methods (see below). In addition, the presence of the parasite could be demonstrated in some patients by xenodiagnosis²⁷ and/or polymerase chain reaction (PCR).²⁸

A second, independent set of well-characterized panel samples was tested for validation of the proposed algorithm. Positive samples (n = 75) were documented by up to eight assays. Negative samples (n = 148) included sera from various diseased patients (n = 20), patients with leishmania infection (n = 40), unscreened European blood donors (n = 45), and screened Brazilian blood donors (n = 43). The leishmania-infected sera were part of a previous study²⁹ and included sera from patients with visceral leishmaniasis (n = 20) and tegumentary leishmaniasis (n = 20). The patients were diagnosed by histopathologic examination of biopsies, and the parasites were isolated by culture of material obtained from the lesions.

Serologic characterization

All samples were serologically characterized by four screening assays, an in-house ELISA and three commercial enzyme immunoassays (EIAs), as described recently by Oelemann et al.³⁰ The results of the four assays were used to establish an interpretation algorithm for the new line immunoassay (INNO-LIA Chagas Ab [INNO-LIA], Innogenetics N.V., Ghent, Belgium).

For the in-house ELISA, the cytosolic fraction of *T. cruzi* strain Y epimastigotes was used as the antigen, and sera were tested at a 1-in-200 dilution. After incubation with anti-human IgG peroxidase conjugate, the immune complexes were developed with 2,2',5,5'-tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide (TMB/H₂O₂, Sigma, St. Louis, MO) and absorbencies read at 450 nm. Cutoff values were empirically determined by dividing the difference in the average absorbencies of two positive and three negative controls by 3: (Average absorbency of 2 positive controls - average absorbency of 3 negative controls)/3.

Commercial EIAs included the Abbott Chagas antibody EIA (Abbott Laboratorios do Brasil, São Paulo, Brazil), the BIOELISACRUZI (Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brazil), and the BIOZIMA Chagas (Polychaco S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina). All tests were carried out according to the instructions provided by the manufacturers.

All of these sera had also been tested at a final dilution of 1-in-40 with either a commercial or an in-house IFA according to Camargo,³¹ using *T. cruzi* strain Y epimastigotes as antigen and fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG (Cappel Biomedical, Malvern, PA). In addition, some sera were characterized by an in-house Western blot, as described previously.³ Briefly, the cytosolic fraction of *T. cruzi* epimastigotes (Y strain) was submitted to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in 10-percent acrylamide gels and subsequently transferred to nitrocellulose membranes. Diluted serum samples (1-in-100) were then added to the membranes, and the immune complexes formed were revealed by using anti-human IgG peroxidase conjugate and then a color reaction. Sera were considered positive when they reacted with at

least three bands from a group of seven (14-, 19-, 27-, 30-, 34-, 37-, and 75-kDa).

INNO-LIA

The INNO-LIA consists of seven recombinant *T. cruzi* antigens coated as discrete lines onto a nylon membrane with plastic backing. In addition, the strips contain control lines for sera with strong, moderate, and weak (cutoff) reactivity, as well as a streptavidin background control. The antigens were derived from the sequences of the following recombinant antigens: Ag 39,¹² TcD,³² Tc24,³³ SAPA,³⁴ MAP,³⁵ and CRA and FRA.¹⁴ The strips were incubated with the sera at a 1-in-100 dilution for 18 hours at 25°C, and, after washing, the immune complexes were detected by incubation with an anti-human IgG conjugate and subsequent color development. Results were determined by visually comparing the intensities of the antigen lines with those of the controls. The intensities were scored as follows: 0 (-), absent or less intense than the weak control line; 0.5 (±), intensity higher than or equal to that of the weak control line but lower than the 1+ control line; 1 (+), intensity equal to that of the 1+ control line; 2 (++) , intensity between that of the 1+ control line and of the 3+ control line; 3 (+++) , intensity equal to that of the 3+ control line; and 4 (++++), intensity higher than that of the 3+ control line. The INNO-LIA results can thereby be expressed as a numeric value, that is, the sum of intensities of the various antigen bands. Fig-

ure 1 shows representative INNO-LIA results and their respective interpretations.

On the basis of reactivity in the four screening assays and the pattern of reactivity with the multiple antigens used in the INNO-LIA, an algorithm was established (Fig. 2). Those study samples for which the four screening assays employed were either all positive (thus considered as true-positive samples; n = 500) or all negative (considered as true-negative samples; n = 460) were selected to define an INNO-LIA interpretation algorithm. The algorithm illustrated in Fig. 2 was optimized for sensitivity and specificity on the basis of this subset of samples. The remaining samples (n = 102) with conflicting results in the screening assays were then classified by use of the established algorithm as being INNO-LIA-negative, INNO-LIA-positive, or INNO-LIA-indeterminate.

Statistical methods

Software (GraphPad StatMate, version 1.01, GraphPad, San Diego, CA) was used for the calculation of 95% CIs for proportions.

RESULTS

Evaluation of the INNO-LIA using chagasic sera

To evaluate the performance of the INNO-LIA, we analyzed 1062 sera and compared the results with those obtained in

Serum number	Strip number	Control sv	Antigens							SV	Scores							INNO-LIA result	
			3+	1+	±	A	B	C	D		E	F	G	Σ					
C+	1									-	1	2	1	3	3	0.5	4	14.5	+
C-	2									-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
VL3	3									-	0.5	3	0.5	0.5	2	-	4	10.5	+
VL6	4									-	1	2	0.5	4	3	0.5	4	15	+
VL10	5									-	0.5	0.5	-	1	2	1	3	8	+
VL16	6									-	1	-	-	2	2	-	3	8	+
VL59	7									-	0.5	-	-	3	4	-	2	9.5	+
PI8798	8									-	2	0.5	-	1	-	-	2	5.5	+
PI8807	9									-	-	-	-	2	1	0.5	-	3.5	+
PI8810	10									-	0.5	-	-	-	2	-	2	4.5	+
PI8864	11									-	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5	N
PI8895	12									-	-	1	0.5	-	-	-	-	1.5	N
PB6	13									-	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5	N
PB7	14									-	1	-	-	-	0.5	-	-	1.5	+
AM10.1	15									-	0.5	-	-	-	1	-	-	1.5	+
AM15.1	16									-	-	-	-	-	-	1	-	1	N
PB37	17									-	-	-	-	-	1	0.5	2	3.5	+
PB122	18									-	-	-	-	-	1	0.5	-	1.5	+
PB140	19									-	-	-	-	0.5	-	-	1	1.5	Ind
PB19	20									-	-	-	-	-	-	2	-	2	N
PB323	21									-	0.5	-	-	-	2	-	1	3.5	+
PB155	22									-	0.5	-	-	-	3	-	2	5.5	+
PB167	23									-	-	-	-	-	3	-	-	3	N
PB168	24									-	0.5	-	-	0.5	-	0.5	3	4.5	+
PB170	25									-	-	-	-	-	0.5	-	2	2.5	+
PB197	26									-	-	-	-	-	3	1	4	8	+

Fig. 1. Representative INNO-LIA strips with various reactivity patterns. SV = streptavidin background control, 3+ = strong intensity control, 1+ = moderate intensity control, ± = weak (cutoff) intensity control, N = negative, and Ind = indeterminate. Antigens: A = Tc24, B = CRA, C = FRA, D = TcD, E = MAP, F = SAPA, and G = Ag39.

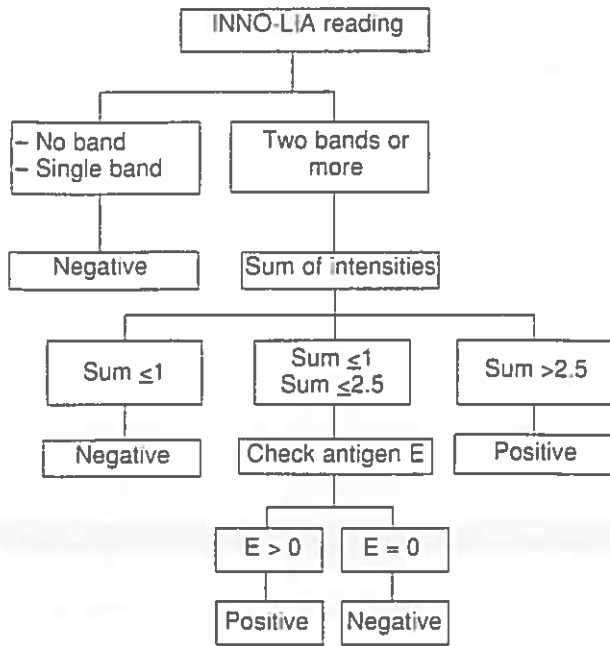


Fig. 2. Algorithm for the interpretation of INNO-LIA Chagas Ab assay results.

four screening assays, an in-house ELISA and three commercial EIAs. The results are summarized in Table 1.

According to the algorithm established in this study (Fig. 2), a sample was considered negative if either no band or only one single band appeared, or if two or more bands with a total score of ≤ 1 appeared; a sample was considered positive when at least two bands with total intensities > 2.5 appeared. If two or more bands with a sum of intensities > 1 but ≤ 2.5 appeared, the sample was considered indeterminate if the antigen E line scored 0, and positive when the score of antigen E was higher than 0. A sample could not be interpreted when the streptavidin control line showed a rating ≥ 1 .

A total of 460 sera (43.3%) were negative in all four screening assays. Of these, 458 (99.6%) were also negative in the INNO-LIA. One serum gave an indeterminate result, while another serum was INNO-LIA positive. Fifty-four sera (5.1%) were classified as "likely negative," as they were found to be either negative in two of the screening assays and doubtful in the remaining assays or positive in one assay but negative in the three remaining tests. Of the likely negative sera, the INNO-LIA was able to confirm 41 sera (75.9%) as negative and 11 sera (20.4%) as positive. Two sera (3.7%) were INNO-LIA indeterminate.

Thirty-eight sera (3.6%) were classified by the screening tests as

"likely positive" (i.e., either positive in two tests and doubtful in two other tests or positive in three tests and negative in one). Of these, the INNO-LIA confirmed 32 sera (84.2%) as positive, while 2 (5.3%) were INNO-LIA indeterminate, and 4 (10.5%) were INNO-LIA negative. Of the 500 (47.1%) sera positive in all four screening assays, 499 sera (99.8%) were also positive in the INNO-LIA, and 1 serum was negative. However, on the basis of the results obtained in the four screening assays, 10 sera (0.9%) were considered controversial (i.e., two tests positive, the other two tests negative). Of these sera, 4 were INNO-LIA negative, 1 INNO-LIA indeterminate, and 5 INNO-LIA positive.

Of the 11 INNO-LIA-positive and ELISA-likely negative sera, 6 were positive in at least one supplemental assay, including one serum that was positive in PCR. The remaining 5 samples were negative or doubtful in supplemental assays, but were not tested by PCR. Of the 4 INNO-LIA-negative and ELISA-likely positive sera, 2 were negative in all supplemental assays and 2 were positive in two supplemental assays.

Of 1062 sera tested, 6 (0.6%) were INNO-LIA indeterminate. One serum (PB140) was negative in all supplemental assays. The remaining 5 sera reacted as positive or doubtful in at least one of the supplemental assays. None of these samples were tested with PCR. Finally, 1 sample was INNO-LIA positive and ELISA negative (negative in all supplemental assays), and 1 sample was INNO-LIA negative and ELISA positive (positive in 2 supplemental assays). None of these samples were tested by PCR.

In sera that were positive in all four screening assays, the INNO-LIA showed a sensitivity of 99.8 percent (true positives/[true positives + false negatives]; 499/[499 + 1]; 95% CI: 98.89-99.99) and a specificity of 99.8 percent (true negatives/[true negatives + false positives]; 458/[458 + 1]; 95% CI: 98.79-99.99) if INNO-LIA-indeterminate results are excluded.

Finally, the validation set of samples to confirm the algorithm contained 75 positive samples from various panels and 148 negative samples, including 40 leishmania-documented infections. The INNO-LIA was able to detect 75 of 75 positive samples, for a sensitivity of 100 percent

TABLE 1. Comparison of results with the INNO-LIA assay and other screening assays

INNO-LIA	Results of four screening assays				Total
	Negative	Likely negative*	Controversial†	Likely positive	
Positive	1	11	5	32	548
Indeterminate	1	2	1	2	6
Negative	458	41	4	4	508
Total	460	54	10	38	1062

* Negative in two different tests and doubtful in the remaining tests or negative in three tests and positive in one test.
 † Positive in two tests and negative in two other tests.
 ‡ Positive in two tests and doubtful in the remaining tests or positive in three tests and negative in one test.

(95% CI: 95.21-100). The specificity reached 99.32 percent (147/148); only one negative sample was classified as indeterminate by INNO-LIA. Of the 20 sera obtained from patients with visceral leishmaniasis and the 20 from patients with tegumentary leishmaniasis, none were reactive in INNO-LIA. In contrast, all visceral leishmaniasis sera and 2 (10%) tegumentary leishmaniasis sera gave a positive reaction when tested in IFA on *T. cruzi* epimastigotes, and 3 visceral leishmaniasis sera and 1 tegumentary leishmaniasis serum were either indeterminate or positive in the Abbott Chagas antibody EIA.

DISCUSSION

In the present study, we evaluated a new assay designed for the detection of IgG antibodies against *T. cruzi* in sera of patients with Chagas' disease, which is intended for use in the confirmation of results obtained by other serologic assays for routine diagnosis and blood bank screening. The interpretation algorithm was based on the subset of samples that were either positive or negative in four screening assays. In serum panels obtained in four endemic Brazilian regions, the INNO-LIA showed an optimized sensitivity of 99.8 percent (95% CI: 98.89-99.99) and an optimized specificity of 99.8 percent (95% CI: 98.79-99.99) for sera with matched results in four screening tests. The interpretive algorithm was assessed with an independent set of samples and showed a sensitivity of 100 percent (95% CI: 95.21-100) and a specificity of 99.32 percent (95% CI: 99.29-99.98) using well-characterized positive ($n = 75$) and negative ($n = 148$) samples. Because of the limited number of indeterminate samples in INNO-LIA ($n = 6$), further optimization of the algorithm could not be achieved. However, their weak reactivity pattern (i.e., Fig. 1, Strip 19), combined with the screening results (Table 1), suggests a negative rather than a positive serology for such samples.

An important feature of the INNO-LIA is the utilization of seven recombinant, synthetic peptide antigens that are coated as separate lines onto a reinforced membrane. As such, the assay can simultaneously check the sera for the presence of a broad spectrum of *T. cruzi*-specific antibodies that can bind to their respective antigens without steric hindrance. Such interference has been known to occur when a mixture of antigens is used to sensitize microwells, because the various molecules are packed tightly together in a limited physical space, which results in a loss of assay sensitivity.³⁶

Pastini et al.⁹ recently reported the development of a new assay (Dia Kit Bio-Chagas assay, Gador S.A., Buenos Aires, Argentina). This test employs five recombinant *T. cruzi* antigens expressed as glutathione S-transferase fusion proteins. A mixture of the antigens is coated as a single line onto a reinforced nitrocellulose membrane, together with a second human IgG control line to monitor the conjugate and subsequent color-development steps. The authors

found a sensitivity of 99.6 percent and a specificity of 99.1 percent upon assessment of 300 positive and 350 negative sera (matched indirect hemagglutination assay, IFA, and ELISA results). However, the kit gave a positive result for 4 of 16 sera obtained from patients with visceral leishmaniasis. In our study, the specificity of the INNO-LIA was challenged with a collection of 20 sera from patients with visceral leishmaniasis and 20 sera from patients with tegumentary leishmaniasis. None of these sera reacted in the INNO-LIA, which indicated a fairly optimized specificity with respect to cross-reactive antibodies specific for *Leishmania* sp.

Analysis of the data obtained in the present study showed that all sera with either indeterminate INNO-LIA results or INNO-LIA results that conflicted with the screening assay classification originated from Paraiba and the Amazon. These regions are known to be problematic in terms of Chagas' disease serology, as patients from these areas present low serologic titers against *T. cruzi* and are mostly asymptomatic.²² Xenodiagnosis and PCR studies carried out in Paraiba showed that the parasitemia in patients with chronic disease is extremely low,³⁷ thus providing an acceptable explanation for the low antibody titer. Moreover, the Amazon region is known to be co-endemic for *T. rangeli*, which can lead to false-positive results in screening assays for antibodies to *T. cruzi*.^{38,39}

Only one serum gave a possibly false-negative reaction in the INNO-LIA, and one serum gave a possibly false-positive result (see Table 1). The possibly false-positive serum was negative in all four screening assays, as well as in an in-house Western blot and IFA. Thus, within the setting of blood bank screening, the former sample would not be subjected to confirmation. The possibly false-negative serum was positive in the four screening assays and in IFA and Western blot. However, because the sample was obtained in the Amazon region, the possibility of a *T. rangeli* infection cannot be completely ruled out. Antibodies against this nonpathogenic parasite could give false-positive results in the four screening assays as well as in Western blot and IFA, inasmuch as all these tests employ either crude or fractionated parasite antigen preparations. On the other hand, the use of crude *T. cruzi* reagents for the screening assays can result in consistent cross-reactivity with samples from patients infected with *Leishmania* sp. Such a possibility cannot be completely ruled out in a retrospective study. Unfortunately, the PCR status of these samples was unknown, and thus a more definitive conclusion concerning these samples could not be established.

The results presented in this study show that the INNO-LIA is a reliable confirmatory assay in the serodiagnosis of Chagas' disease, with the potential to discriminate false-positive results caused by either *T. rangeli* or *Leishmania* sp. An additional, ongoing study involving a large number of samples from routine testing for Chagas' disease serology will be of use in reconfirming the present algorithm

and evaluating its performance in screening-reactive and less well documented samples.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Carlos A.B. de Souza for excellent technical assistance; Regina dos Santos Braz, MS, and Selma Jeronimo, MD, PhD, supplied the sera panels from patients with visceral leishmaniasis; and Fred Shapiro critically reviewed and edited the manuscript.

REFERENCES

1. Moncayo A. Chagas' disease. TDR Eleventh Program Report. Geneva: World Health Organization, 1993:62-75.
2. Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 1991;31:547-57.
3. Dias JC. Epidemiology of Chagas' disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A, eds. Chagas' disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT Brazil, 1992:49-80.
4. Teixeira MG, Borges-Pereira J, Netizert E, et al. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer-blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol* 1994;45:308-12.
5. Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, et al. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroreactivity. *Transfusion* 1995;35:219-25.
6. Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CL, et al. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 1995;33:2082-5.
7. Krieger MA, Almeida EC, Oelemann W, et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:427-34.
8. Paranhos-Bacalla GS, Santos MR, Cotrim PC, et al. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol* 1994;16:165-9.
9. Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, et al. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. *Clin Chem* 1994;40:1893-7.
10. Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1994;32:971-4.
11. Vergara U, Veloso C, Gonzalez A, Lorca M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:39-43.
12. Hoft DF, Kim KS, Otsu K, et al. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immunol* 1989;57:1959-67.
13. Ibañez C, Affranchino JL, Frasch AC. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol Biochem Parasitol* 1987;25:175-84.
14. Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol* 1989;35:127-36.
15. Levin MJ, da Silveira JF, Frasch AC, et al. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 1991;4:11-9.
16. Moncayo A, Luquetti AO. Multicenter double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:489-95.
17. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida EC, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 1993;33:830-4.
18. Almeida EC, Krieger MA, Carvalho MR, et al. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:513-7.
19. Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, et al. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:519-22.
20. Borges-Pereira J. Doença de Chagas humana: Estudo da infecção crônica, morbidade e mortalidade em Virgem da Lapa. MG, Brasil (1976-1996) (dissertation). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.
21. Pereira JB, Coura JR. [Morbidity of Chagas' disease. Cross sectional study in an endemic area, Virgem da Lapa Minas Gerais]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1986;19:139-48.
22. Pereira JB, Coura JR. [Morbidity of Chagas' disease in urban populations of the Paraíba sector]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987;20:101-7.
23. Coura JR, Barrett TV, Naranjo MA. [Human populations attacked by wild Triatominae in the Amazons: a new form of transmission of Chagas' disease?]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:251-4.
24. Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, et al. [Morbidity of Chagas disease in areas of Sertão da Paraíba and Caatinga do Piauí]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:197-205.
25. Coura JR, de Abreu LL, Dubois LE, et al. [Morbidity of Chagas' disease: II-Sectional studies in four field areas in Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:101-24.

26. Coura JR, Willcox HP, Arboleda Naranjo M, et al. Chagas' disease in the Brazilian Amazon: III. A cross-sectional study (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995;37:415-20.
27. Cerisola JA, Rohwelder R, Prado CE. [Yield of xenodiagnosis in human chronic Chagas' infection using nymphs of different species of triatomid bugs]. *Bol Chil Parasitol* 1971;26:57-8.
28. Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, et al. 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* 1994;51:771-7.
29. Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:386-8.
30. Oelemann WM, Teixeira MG, Verissimo da Costa GC, et al. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1998;36:2423-7.
31. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1966;8:227-35.
32. Burns JM Jr, Shreffler WG, Rosman DE, et al. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1239-43.
33. Taibi A, Plurnas-Marty B, Guevara-Espinoza A, et al. *Trypanosoma cruzi*: immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T-cell epitope with protective activity. *J Immunol* 1993;151:2676-89.
34. Afranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989;34:221-8.
35. Kerner N, Liegeard P, Levin MJ, Hontebeyrie-Joskowicz M. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp Parasitol* 1991;73:451-9.
36. Butler JE. Perspectives, configurations and principles. In: Butler JE, ed. *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991:3-26.
37. Britto C, Cardoso MA, Santoro A, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 1995;81:462-71.
38. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, et al. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as complication of Chagas' disease. *Parasitology* 1987;94:475-84.
39. Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:278-9. ■

Erratum

Page 714, Figure 2:

$\text{Sum} \leq 1$
 $\text{Sum} \leq 2,5$ should read $\text{Sum} > 1$
 $\text{Sum} \leq 2,5$

Page 714, Figure 2:

$E = 0$
Negative should read $E = 0$
Indeterminate

Page 714, Table 1:

Likely Positive ~~Positive~~ should read Likely Positive ~~Positive~~ Positive

Page 713, Figure 1

Serum number VL10
PI8895 Lia Result blank
N should read Lia Result +
IND

TRABALHO 3

Screening and confirmation in Chagas disease serology – A contribution.

Oelemann WMR, Teixeira MGM & Peralta JM

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 307-308, 1999.

Screening and Confirmation in Chagas Disease Serology - A Contribution

WMR Oelemann/⁺, MGM Teixeira, JM Peralta

Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ, 21944-970
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Key words: Chagas disease - serology - *Trypanosoma cruzi*

In recent years, our group reported the development of two enzyme-linked immunoassays utilizing synthetic peptides (Peralta et al. 1994) or epimastigote lysates (Teixeira et al. 1994) as antigens, and the evaluation of commercial tests designed for either screening (Oelemann et al. 1998) or confirmation (Oelemann et al. 1999) in Chagas disease serology.

In order to develop an Elisa for the specific detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies (Peralta et al. 1994), two peptides, TcD and PEP2, were used either separately or in combination. The Elisa was evaluated employing a panel of 260 sera obtained from chagasic patients (n=179) and healthy residents (n=81) living in Virgem da Lapa, Minas Gerais, where Chagas disease is endemic. In addition, 37 sera obtained from patients with other pathologies, such as leprosy, tuberculosis and leishmaniasis, were employed to assess specificity. The results showed that each peptide alone presented a sensitivity of 93.8% and 91.6% (TcD and PEP2, respectively), whereas the combined peptides showed a sensitivity of 99.4%. The respective specificities were reported to be 93%, 91% and 98.7% (Peralta et al. 1994).

In another study (Teixeira et al. 1994) we developed a protocol for a *T. cruzi*-specific Western blot using the cytosolic fraction of strain Y epimastigotes as antigen. The test was evaluated with a slightly smaller panel of sera derived from the one described above (i.e. 160 from chagasic patients, 75 from healthy individuals residing in the same area, and 37 from patients with unrelated diseases). A reaction was considered positive when at least three out of seven antigen bands (14, 19, 27, 30, 34 and 75 kDa) were present. The result was indeterminate with the appearance of only two

bands, and negative with only one or no band. Using this algorithm, the test showed a sensitivity of 99.3% and a specificity of 100% (Teixeira et al. 1994).

In order to assess the diagnostic performance of commercially available screening tests we evaluated in a next step (Oelemann et al. 1998) the Abbott Chagas antibody EIA, the Biolab BIOELISACRUZI® and the BIOZIMA Chagas kit. The sera employed were obtained from patients and healthy residents of four Brazilian areas where Chagas disease is either endemic or emergent and where clinical manifestations of the disease and circulating *T. cruzi* strains vary. All three tests employ antigen preparations of *T. cruzi* strain Y obtained by different protocols. The results obtained with each kit were compared to matched in-house Elisa (using the cytosolic fraction of *T. cruzi* strain Y as antigen) and immunofluorescence data. Thus, we employed 180 positive and 81 negative sera obtained in Virgem da Lapa, Minas Gerais (see above), where the cardiac and digestive forms of the disease are common; 135 positive and 305 negative sera from Paraíba and 202 positive and 44 negative sera from Piauí where the indeterminate form of the disease is common; and 3 positive and 75 negative sera obtained in the Amazon region where Chagas disease is emergent. The complete panel consisted of 520 positive and 505 negative sera. Our results demonstrated that depending on the area the three commercial kits produced specificity values between 93.3 and 100%, sensitivity values between 97.7 and 100% and accuracies between 93.6 and 100%, with none of the kits attaining 100% in all three categories (Oelemann et al. 1998).

These findings emphasize the need of a more specific and accurate test for confirmation, which should be based on cloned antigens or synthetic peptides rather than crude parasite fractions.

A good candidate for a confirmatory test is the INNO-LIA Chagas Ab. This novel line immunoassay combines several relevant immunodominant recombinant and synthetic antigens coated in separate locations onto a single nylon membrane strip.

*Corresponding author. Fax: +55-21-560.8344. E-mail: immwal@microbio.ufrj.br

Received 9 June 1999

Accepted 9 August 1999

This physical separation of the different antigens prevents sterical hindrance during antibody binding which may be a problem if a mixture of the antigens is used in a single well of an Elisa plate. In an optimization step (Oelemann et al. 1999) we employed 1.062 sera from patients and healthy residents of the four above-mentioned areas and compared the results obtained with the INNO-LIA Chagas Ab to those obtained with four screening tests: our in-house Elisa and the three commercial assays (see above). The data was used to establish a confirmation algorithm, which was subsequently validated with an independent panel of well-characterized samples (75 positive and 148 negative for Chagas disease). The INNO-LIA Chagas Ab showed a sensitivity of 100% and a specificity of 99.32%. Furthermore, the assay was 100% specific when evaluated with sera from 40 patients with confirmed leishmaniasis (Oelemann et al. 1999).

Today, transfusion of blood from infected donors constitutes the major route of contracting Chagas disease and an annual number of 20,000 transfusion-acquired Chagas disease cases in a total of 5 to 6 million blood transfusions have been reported for Brazil (Dias 1992). In Brazilian blood banks the screening of donors for Chagas disease by at least two tests based on different methodologies is obligatory. For donors who are positive in only one test the result is usually confirmed by a third test. However, in practice, the blood bags are discharged even if they give a negative result in this confirmatory test. Therefore, to avoid unnecessary losses of blood, the negative result obtained

in an ideal test for confirmation must be sufficiently convincing to overcome a single positive result obtained in one of the screening test. In our opinion this can only be achieved by employing in an individual test as many immunodominant antigens as possible. The confirmatory test described above certainly represents an example for a new line of immunoassays, thus showing the way to go.

REFERENCES

- Dias JCP 1992. Epidemiology of Chagas disease. p. 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.
- Oelemann WMR, Teixeira MGM, Verissimo da Costa GC, Borges-Pereira J, de Castro JAF, Coura JR, Peralta JM 1998. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol* 36: 2423-2427.
- Oelemann WMR, Vanderborcht BOM, Verissimo da Costa GC, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, de Castro JAF, Coura JR, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M, Peralta JM 1999. A recombinant and peptide antigen line immunoassay optimized for confirmation of Chagas disease. *Transfusion*, in press.
- Peralta JM, Teixeira MGM, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM, Sleath PR, Reed S 1994. Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 32: 971-974.
- Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Netizert E, Souza MLNX, Peralta JM 1994. Development and evaluation of an enzyme-linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chaga disease. *Trop Med Parasitol* 45: 308-312.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As dificuldades sócio-econômicas que ocorreram na América Latina estimularam a migração das populações de áreas rurais para centros urbanos, principalmente nos anos de 1970 e 1980, assim alterando o padrão epidemiológico tradicional da doença de Chagas. A partir de condições tipicamente rurais, esta infecção adquiriu características urbanas, podendo ser transmitida por transfusão sangüínea (Moncayo 1999). Portanto, esta via passou a ser considerada um dos mecanismos de transmissão mais importantes, principalmente nos grandes centros urbanos (Schmuñis 1991 e 1999). Este fato tem representado uma grande ameaça para a segurança de serviços de hemoterapia, principalmente em países onde a doença de Chagas não é endêmica, como Estados Unidos e Canadá, onde casos de doença de Chagas aguda, por transfusão de hemoderivados, têm sido registrados (Grant et al. 1989; Nickerson et al. 1989; Schmuñis 1991; Kirchhoff 1993). Considerando o elevado número de doadores de sangue infectados em todo o continente, é estimado que milhares de novos casos de infecção chagásica transfusional possam ocorrer anualmente (Dias 1979, WHO 1991, Moncayo 1999). Para que este problema seja controlado é indispensável que se faça uma rigorosa triagem nos bancos de sangue, seguindo-se as recomendações da Organização Mundial da Saúde, ou seja, utilizando, pelo menos 2 técnicas de princípios diferentes.

Conseqüentemente, o aperfeiçoamento dos métodos para o diagnóstico da doença de Chagas, tem sido o foco de intensa pesquisa. No entanto, melhorias no diagnóstico sorológico da doença de Chagas dependem em parte da padronização dos reagentes e testes utilizados, uma vez que os principais problemas enfrentados na rotina laboratorial estão na adaptabilidade de técnicas que permitam sua fácil realização e baixo custo, a sensibilidade que possibilite a detecção de todos os casos de infecção e a especificidade que assegure um diagnóstico confirmatório da doença em suspeita. Entretanto, uma grande variedade de procedimentos, tanto na preparação de insumos como na utilização de diferentes testes sorológicos, levam a resultados muito variáveis. Além disso, a complexidade antigênica existente em lotes sucessivos de antígenos produzidos a partir da mesma cepa ou de cepas diferentes e

a reatividade cruzada entre tripanossomatídeos relacionados, principalmente *Leishmania sp* e *T. rangeli*, devido a apresentarem determinantes antigênicos comuns, também têm contribuído como fatores limitantes ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas (Camargo 1966, Camargo & Rebonato 1969, Nery-Guimarães et al. 1969, Saldaña & Sousa 1996).

Embora a detecção do parasita viável ou de seus componentes seja a mais forte evidência da infecção, os métodos empregados para esta finalidade (xenodiagnóstico, hemocultura e PCR) não são adequados para serem utilizados em diagnóstico de triagem de bancos de sangue. Além disso, como a parasitemia na fase crônica é muito baixa, os métodos de detecção do parasita utilizados nem sempre alcançam a sensibilidade desejada. O diagnóstico sorológico se beneficia do fato dos anticorpos aparecerem no sangue muito cedo, ainda na fase aguda da infecção, e de se manterem continuamente ao longo de toda a fase crônica da doença. Conseqüentemente, a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* é o método de eleição para o diagnóstico etiológico da infecção chagásica na fase crônica, sendo o mais econômico, rápido e eficaz.

Entre as várias reações sorológicas utilizadas para o diagnóstico da infecção chagásica, os testes de IFI, HAI e ELISA são os mais freqüentemente empregados e nos últimos anos vários "kits" têm sido comercializados por diferentes empresas.

O presente estudo teve como um dos objetivos avaliar e comparar testes sorológicos de fonte comercial. Este estudo foi iniciado pela caracterização de 4 painéis de amostras de soro de indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas (Virgem da Lapa, MG; Sertão da Paraíba, PB; Caatinga do Piauí, PI) ou emergentes (Barcelos, AM) para a doença de Chagas. Para tal, foram empregados os testes de IFI e ELISA (com reagentes preparados em nosso laboratório) e de 1065 amostras de soro analisadas, 520 foram positivas, 505 foram negativas e 40 foram consideradas inconclusivas, devido a discordância de resultados entre os dois testes. Em relação ao diagnóstico da infecção chagásica, não existe um método que seja realmente considerado como padrão ouro, no entanto, o teste de IFI tem sido aceito como teste de referência (Ferreira & Moraes de Ávila 1995). Entre as amostras de soro de Minas Gerais nenhuma foi caracterizada como inconclusiva, já entre as amostras do sertão da Paraíba, da caatinga do Piauí e do Amazonas, 26 (5,6%), 7 (2,8%) e 7 (8,2%), respectivamente, foram consideradas como

inconclusivas. Uma explicação para estes resultados discordantes seria a ocorrência de outros tripanossomatídeos nas áreas estudadas, o que contribuiria para o aparecimento de reatividade cruzada por antígenos comuns (Sousa & Johnson 1973; Araújo 1986; Chiller, Samudio & Zoulek 1990). Em Virgem Lapa, MG, não há a ocorrência de *Leishmania* sp (Borges-Pereira, 1998 comunicação pessoal), porém nas áreas da Paraíba e Piauí a presença de *Leishmania* sp é freqüente. Na área do Amazonas, além da presença de *Leishmania* sp, que pode ter contribuído para o nível de prevalência descrito (Coura et al. 1994, Coura et al. 1995), também foi demonstrada a presença do *Trypanosoma rangeli* (Coura et al. 1996b).

Anteriormente, estes mesmos 4 painéis de amostras de soros, também foram analisadas em nosso laboratório (Oelemann et al. 1996) quanto ao nível de reatividade no teste de ELISA. Para isto, foram utilizadas 3 diluições de cada soro, 1/40, 1/200 e 1/1000, com o objetivo de classificar as amostras de soro positivas de cada painel (180 de Minas Gerais, 202 do Piauí, 135 da Paraíba e 3 do Amazonas), quanto ao grau de reatividade. Estas foram então subdivididas em 3 grupos: grupo I – alta reatividade (com índice de reatividade (IR) > 4,5 na diluição de 1/1000), grupo II – média reatividade (com IR < 4,5 na diluição de 1/1000 e >2,5 na diluição de 1/200) e grupo III – baixa reatividade (com IR < 2,5 na diluição de 1/200).

Em relação as amostras de soros classificadas no grupo I (alta reatividade) foi observado um percentual maior na região de Minas Gerais (47,3%) do que nas áreas da Paraíba e Piauí (28,8% e 32,2%, respectivamente). No grupo II (média reatividade) maiores percentuais foram observados nas regiões da Paraíba e Piauí (51,1% e 56%, respectivamente) em relação a Minas Gerais (41,1%) e no grupo III houve predomínio da região do sertão da Paraíba (20%) em relação a Minas Gerais e Piauí (11,6% e 12,8%, respectivamente). Borges-Pereira, Willcox & Coura (1987) analisando os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* de amostras de soros destas três regiões, através do teste de IFI, também detectaram níveis de anticorpos mais altos entre os indivíduos chagásicos de Virgem da Lapa, MG. Estas diferenças de reatividade, observadas no teste de ELISA, podem estar diretamente relacionadas as diferentes predominâncias de manifestações clínicas observadas nessas regiões. Em Virgem da Lapa, MG, há a ocorrência de manifestações mais severas, com predomínio de formas cardíacas e digestivas (37,5% e 7,5%, respectivamente) em relação as regiões da Paraíba e Piauí onde tem-se observado maior predominância

da forma indeterminada (Borges-Pereira 1997). Outro fato que poderia explicar essa diferença de reatividade, são observações feitas em relação a xenopositividade. Em Virgem da Lapa, MG, têm sido relatado índices de xenopositividade de 48,6% - 35% (Borges-Pereira et al. 1989, Borges-Pereira 1997) e na Paraíba de 13% (Borges-Pereira & Coura 1987) e no Piauí de 34% (Coura et al. 1996a). Portanto, a população infectada de Minas Gerais apresenta um nível de parasitas circulantes maior ou uma parasitemia mais persistente do que a população de infectados das regiões do Nordeste. Estas mesmas observações têm sido relatadas em relação à sensibilidade do teste de PCR. Enquanto entre a população de Virgem da Lapa, MG, o teste tem alcançado índices de sensibilidade de 100% e 96% (Avila et al. 1993, Wincker et al. 1994a), no sertão da Paraíba e no Piauí foram detectados índices de 45% e 59%, respectivamente (Britto et al. 1995b, Junqueira, Chiari & Wincker 1996). Uma das hipóteses seria que o sistema imunológico da população de Virgem da Lapa, MG, em condições normais, entraria em contato com um número de parasitas maior ou mais freqüentemente, o que manteria o nível de anticorpos elevado. Por outro lado não podemos descartar a possibilidade dos indivíduos das regiões do Nordeste apresentarem alguma deficiência na resposta humoral a antígenos do *T. cruzi*, o que poderia ocasionar baixos níveis de anticorpos.

Estas diferenças regionais também podem estar relacionadas com as cepas e com os vetores que circulam na região, já que tem sido mostrado a grande heterogeneidade existente entre diferentes cepas ou isolados (Brenner 1977; Miles et al. 1980; Miles et al. 1986; Dias 1992) e os vetores também apresentam características diferentes, em relação a susceptibilidade ao *T. cruzi* e a taxa de domiciliação. Analisando o perfil de proteínas, por SDS-PAGE, de isolados destas três regiões (Teixeira et al. 1996), foi observado um maior grau de similaridade entre isolados da Paraíba e Piauí (em torno de 70%), do que destes com isolado de Virgem da Lapa, MG (aproximadamente 50%).

As diferenças observadas na sensibilidade dos testes sorológicos empregados no diagnóstico da doença de Chagas, podem ser atribuídas às características dos antígenos empregados em cada teste e ou às características genéticas das populações estudadas, que se refletem na resposta humoral. Portanto, é esperado que haja diferença de resposta humoral entre populações de diferentes regiões,

quando se utiliza antígenos de uma determinada cepa.

Desta forma, é relevante a avaliação de "kits" comerciais, com diferentes amostras de soros de populações de áreas endêmicas e não endêmicas, pois nem sempre um teste que apresenta um bom desempenho em determinada região, pode ter o mesmo sucesso em outra região. Este fato não quer dizer, necessariamente, que o "kit" não seja bom, mas que necessita de ajustes na padronização para que possa ser utilizado com diferentes populações. Adicionalmente, deve-se levar em conta alguns fatores como: outras infecções que possam ocorrer na área em questão e o estado imunológico geral da população.

Após a caracterização das amostras de soro das diferentes regiões, os soros positivos e negativos de cada área (180 e 81 de Minas Gerais, 135 e 305 da Paraíba, 202 e 44 do Piauí e 3 e 75 do Amazonas, respectivamente) foram utilizados na avaliação de 3 "kits" de ELISA comerciais: Abbott Chagas antibody EIA, Biolab-Mérieux BIOELISACRUZI kit e o BIOZIMA Chagas kit, que são rotineiramente empregados na triagem de doadores em bancos de sangue para a detecção de anticorpos anti -*T. cruzi*. Tomamos o cuidado de utilizar o mesmo lote de cada teste para todos os soros, para evitar as possíveis influências decorrentes do uso de diferentes lotes, garantindo assim resultados que expressam as características da população e dos testes empregados.

De maneira geral os três testes mostraram bom desempenho com os quatro painéis avaliados. A sensibilidade e especificidade relativa variaram de 98,6% a 100% e 94,7% a 99,8%, respectivamente, em relação ao número total de amostras de soros. Foram observadas algumas diferenças entre os três testes, dependendo da área analisada. As amostras de soros das áreas da Caatinga do Piauí e do Amazonas tiveram uma distribuição desproporcional em relação a amostras positivas e negativas (202 e 44, 3 e 75, respectivamente) e isto pode ter contribuído para algumas diferenças de resultados. Contudo, quando se analisa o número total de amostras dos quatro painéis, onde a distribuição de amostras positivas e negativas foi de aproximadamente 50% cada, pode-se analisar diferenças mais precisas entre os testes.

O teste BIOELISACRUZI mostrou índice de especificidade mais alto (99,8%) em relação aos outros dois testes, gerando mais resultados discrepantes (7) e indeterminados (10) entre as amostras positivas, do que entre as negativas (1

discrepante e 1 indeterminado). Sendo assim, este teste gerou mais resultados falso negativos (7) do que falso positivos (1). Já o teste BIOZIMA Chagas kit apresentou índice de sensibilidade maior (100%), mostrando resultados discrepantes (27) somente entre os negativos. E o teste da Abbott que mostrou índices de sensibilidade bem próximo do teste da BIOZIMA Chagas kit (99%), também apresentou mais resultados discrepantes (16) e indeterminados (8) entre as amostras negativas. O fato de um teste sorológico se mostrar mais sensível ou mais específico pode estar relacionado ao ponto de corte ou limite de reatividade estabelecido para a interpretação do teste. Se o objetivo do exame laboratorial for diagnosticar a infecção de um paciente, escolhem-se testes com elevada especificidade, com isso, tenta-se evitar resultados falso-positivos. Para atingir este objetivo deve-se elevar o ponto de corte. Por outro lado, se o objetivo for o de excluir os falso-negativos, o procedimento é diminuir o ponto de corte. Esta é a situação em serviços de hemoterapia para assegurar a máxima sensibilidade e oferecer um hemoderivado de elevada qualidade. Portanto, a definição do limite de reatividade pode influenciar o desempenho de um teste, podendo este ser ajustado de acordo com sua finalidade.

Outro aspecto que contribui para níveis variáveis de sensibilidade e especificidade é o antígeno empregado no teste. Porém, entre os "kits" avaliados em nosso estudo nenhum informa, na bula, a cepa ou o método de preparo do antígeno utilizado, assim não foi possível a avaliação deste aspecto.

As diferenças observadas nos três "kits", analisando os resultados obtidos com cada painel, podem estar relacionadas com a diversidade de características em relação a manifestações clínicas da doença de Chagas, níveis de parasitemia, cepas e vetores do parasita, já citadas, que existem nas diferentes áreas endêmicas.

Poderíamos dizer que os três "kits" se complementam entre si, pois entre as 63 amostras de soros que apresentaram resultados discordantes ou indeterminados, 21 entre amostras positivas e 42 entre negativas, a maioria (isto é, 52) mostrou estes resultados em apenas um dos testes.

Porém, é necessário ressaltar que a maior percentagem (65%, ou seja 41 de 63) de resultados discordantes ou indeterminados foi obtida entre as amostras de soros da área de sertão da Paraíba. A maioria destas 41 amostras (ou seja, 30 delas) foram consideradas negativas pelos testes de IFI e ELISA "in house" e mostraram

resultados positivos nos "kits" da Abbott ou BIOZIMA, sendo que em oito amostras foram detectados resultados positivos nestes dois "kits": Considerando que estes testes alcançaram os níveis de sensibilidade mais altos (99% e 100%), poderíamos considerar estes resultados como falso-positivos. Como já foi mencionado nesta área foi detectada a presença de *Leishmania*, o que poderia ocasionar reatividade cruzada. Contudo, para se chegar a uma conclusão final é necessário uma investigação mais aprofundada em relação a possíveis infecções que ocorrem naquela área. Por outro lado, não podemos afirmar que os resultados obtidos com os testes que empregamos como referência, IFI e ELISA "in house", reflitam resultados verdadeiros, em relação aos soros considerados discrepantes ou indeterminados nos três "kits" de ELISA. Contudo, a utilização de testes padronizados em nível de laboratório de pesquisa para a caracterização de painéis de soros e posterior avaliação de kits comerciais tem sido descrita por outros autores (Pastini et al. 1994).

A detecção de resultados duvidosos (discordantes ou indeterminados) em testes sorológicos convencionais, tem estimulado o desenvolvimento de testes que apresentem uma maior especificidade na tentativa de solucionar estes resultados. Com este objetivo algumas propostas têm sido feitas, utilizando a técnica de radioimunoprecipitação (RIPA) (Winkler et al. 1995), Western Blot (Teixeira et al. 1994; Umezawa et al. 1996; Mendes et al. 1997; Reiche et al. 1998) e empregando antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos (Peralta et al. 1994; Pastini et al. 1994; Houghton et al. 1999; Umezawa et al. 1999). A combinação de vários antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos tem sido proposta, pois quando são utilizados individualmente, tem-se obtido alta especificidade, mas a sensibilidade nem sempre alcança o nível desejado (Umezawa et al. 1999). No entanto, até o momento não dispomos de nenhum teste comercializado que sirva de auxílio na confirmação desses casos duvidosos.

Portanto, nos pareceu relevante fazer um estudo em colaboração com pesquisadores da Innogenetics N.V., Bélgica, os quais estavam desenvolvendo um novo teste imunoenzimático, que foi denominado INNOLIA Chagas Ab kit. Assim, o painel de 1062 amostras de soros das quatro diferentes áreas endêmicas (Minas Gerais, Paraíba, Piauí e Amazonas), foi empregado na avaliação deste novo teste. O INNOLIA Chagas Ab kit emprega sete antígenos derivados das seqüências dos seguintes antígenos recombinantes: Tc24, CRA, FRA, TcD, MAP, SAPA e Ag39,

todos descritos na literatura e referidos como altamente específicos (Taibi et al. 1993, Lafaille et al. 1989, Burns Jr et al. 1992, Kerner et al. 1991, Affranchino et al. 1989, Hoft et al. 1989). Os resultados obtidos nos quatro testes de ELISA, um "in house" e os três kits comerciais (Abbott, Biolab e Biozima), no estudo anterior foram utilizados como referência. As amostras de soros que apresentaram resultados bem definidos, 500 positivas e 460 negativas, ou seja, que apresentaram resultados concordantes nos quatro testes de ELISA, foram submetidas ao teste INNOLIA e a análise do padrão de reatividade obtida com os 7 antígenos. Após uma análise estatística de resultados, foi estabelecido um algoritmo para interpretação dos resultados. As 102 amostras restantes que apresentaram resultados conflitantes (discordantes ou indeterminados) com os quatro testes de ELISA, foram distribuídas em três grupos: a) "prováveis negativas" (amostras que foram negativas em dois testes e duvidosas nos outros dois ou negativas em três testes e positiva em um), b) "prováveis" positivas (amostras que foram positivas em dois testes e duvidosas nos outros dois ou positivas em três testes e negativas em um) e c) "controversas" (amostras que foram positivas em dois testes e negativas nos outros dois). Estabelecendo-se um algoritmo, estas amostras com resultados conflitantes foram classificadas como positivas, negativas ou indeterminadas. Entre as 54 amostras "prováveis negativas", o INNOLIA conseguiu discriminar como positivo ou negativo 52 (96,3%), sendo 11 consideradas positivas e 41 negativas. Entre as 38 amostras "prováveis positivas", o INNOLIA conseguiu auxiliar na confirmação de 36 (94,7%), sendo 32 consideradas positivas e 4 negativas. Entre as 10 amostras "controversas", o teste definiu melhor 9 (90%), sendo 5 consideradas positivas e 4 negativas. Somente 6 amostras (0,6%) apresentaram resultados indeterminado no INNOLIA, sendo que, 5 destas amostras eram de indivíduos residentes no sertão da Paraíba. Sem dúvida alguma as amostras de soros da área da Paraíba, foram as que apresentaram maiores problemas em relação aos diferentes testes sorológicos empregados em nosso estudo. Os índices de sensibilidade e especificidade obtidos com o painel formado pelas amostras de soro das quatro diferentes áreas endêmicas do Brasil e com o segundo painel utilizado para validar o teste, foram de 99,6% e 99,8% e de 100% e 99,3%, respectivamente.

Alguns dos antígenos empregados no INNOLIA já haviam sido avaliados com amostras de soro de indivíduos residentes em Virgem da Lapa. Almeida et al. (1990) empregando o teste de ELISA com os antígenos recombinantes CRA e FRA,

obtiveram 100% de reatividade com amostras de soros positivas testes convencionais. O peptídeo TcD foi avaliado em nosso laboratório (Peralta et al. 1994) em combinação com outro peptídeo sintético, Pep2 (Ibañez et al. 1987, Vergara et al. 1991) também utilizando o ELISA e identificamos sensibilidade de 99,7% e 99% de especificidade.

Pastini et al. (1994) descreveram um teste imunoenzimático (Dia-kit Bio-Chagas assay; Gabor S.A. Buenos Aires, Argentina), que emprega uma mistura de cinco antígenos recombinantes, adsorvidos a uma fita de nitrocelulose, formando uma única linha. Analisando 300 amostras de soro positivas e 350 negativas, em testes de sorológicos convencionais (HAI, IFI e ELISA), foram obtidos elevados índices de sensibilidade e especificidade, 99,6% e 99,1%, respectivamente. Porém, quando 16 amostras de soros de pacientes com leishmaniose foram testadas, 4 destas apresentaram reatividade no teste. No presente estudo, a especificidade do INNOLIA foi avaliada com 20 amostras de soros de pacientes com leishmaniose visceral e 20 de pacientes com leishmaniose cutânea. Não foi observada reatividade com nenhum destes soros, indicando que o teste não apresenta reatividade cruzada com anticorpos específicos para *Leishmania*.

Recentemente Huoghton et al (1999), descreveram o emprego de um tetrapeptídeo sintético (2/D/E/Lo 1.2) em um teste de ELISA. Os autores utilizaram amostras de soro que haviam sido submetidas ao RIPA, teste utilizado como confirmatório nos Estados Unidos, e foi obtida ótima correlação de resultados. Apenas uma amostra negativa mostrou resultado indeterminado com o tetrapeptídeo. As duas amostras de soros de paciente com leishmaniose, não mostraram reatividade neste teste. Aparentemente, indica ser um teste promissor, porém maiores avaliações ainda são necessárias.

Alguns artificios interessantes são utilizados neste teste: os antígenos são biotinilados e adsorvidos a membrana através do sistema biotina-estreptoavidina, além das sete linhas correspondentes a cada antígeno, cada tira contém quatro linhas que servem de controles, a primeira é de estreptoavidina, e como alguns soros podem apresentar anticorpos anti-estreptoavidina, se houver reatividade nesta linha o teste é invalidado; a segunda linha é composta de anti-IgG humana e serve como controle da adição do soro; a 3ª e 4ª linhas são constituídas de IgG humana em concentrações diferentes, que servem como controle da adição ou viabilidade do conjugado.

Analisando os resultados obtidos no INNOLIA podemos concluir que o teste é

altamente sensível e específico e pode ser empregado como um teste complementar ao diagnóstico da doença de Chagas para auxiliar na confirmação de resultados duvidosos em testes convencionais, utilizados em triagem de doadores em bancos de sangue. Por outro lado, este teste não reúne condições para ser empregado como teste de triagem, pois apesar de ser reação simples, é necessário um tempo longo de incubação com as amostras (18 hs), a leitura é visual e com certeza o seu custo final será mais alto do que os testes já comercializados.

Conclusões

A análise de resultados dos diferentes "kits" de ELISA avaliados neste estudo não revelou diferenças significativas, ou seja, todos apresentaram altos índices de sensibilidade relativa (>98%) e a especificidade relativa variou de 94,7% a 99,8%, em relação ao número total de amostras de soro.

Com o algoritmo estabelecido, o teste INNOLIA mostrou ser um valioso instrumento de auxílio no diagnóstico da infecção chagásica, em casos de sorologia duvidosa..

O teste INNOLIA apresentou alta especificidade (100%) e sensibilidade (99,6%), quando comparado com outros testes sorológicos.

O teste INNOLIA emprega antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de alta especificidade, que foi revelado pela ausência de reatividade cruzada com amostras de soros de pacientes com leishmanioses.

Os testes sorológicos avaliados neste estudo apresentaram maior discordância de resultados com as amostras de soros oriundas de soros de indivíduos residentes na região do Nordeste do Brasil.

PARTE II

INTRODUÇÃO

1. Características do genoma do *T. Cruzi*

Da mesma forma que os demais eucariontes, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma complexa rede de moléculas circulares de DNA, denominada de cinetoplasto.

O conteúdo de DNA dos tripanossomatídeos tem sido estimado por diferentes metodologias e em relação ao *T. cruzi* foi observado que o conteúdo de DNA total (núcleo + cinetoplasto) varia intensamente entre as diferentes cepas e clones, existindo inclusive variações entre clones derivados de uma mesma cepa. (Lanar et al. 1991; McDaniel & Dvorak 1993). As variações no conteúdo de DNA refletem diretamente no número e tamanho de cromossomos nas diferentes cepas e clones do parasita. A quantidade de DNA por célula varia de 0,125 a 0,330 pg, incluindo o DNA do cinetoplasto. O tamanho do DNA nuclear varia aproximadamente de 100 a 200 x 10⁵ pares de bases (pb). Com o desenvolvimento da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE, "*pulsed field gel electrophoresis*") (Schwarz & Cantor, 1984), que permite a separação de moléculas de DNA de tamanho $\geq 10^5$ pb, tem sido possível a análise do perfil de cromossomos (Engman et al. 1987, Wagner & So 1990, Henriksson et al. 1990; Cano et al. 1995). Devido a grande diferença observada no perfil destas bandas cromossômicas, e a uma limitação na capacidade de resolução do método de separação, que não distingue bandas que estão co-migrando, o número exato de cromossomos ainda não é conhecido. No entanto, alguns autores acreditam que o *T. cruzi* contenha aproximadamente 40 a 64 cromossomos (Henriksson et al. 1990, Cano et al. 1995).

Uma característica geral dos tripanossomatídeos é o arranjo de muitos genes em múltiplas cópias, presentes em um mesmo cromossomo ou em diferentes

cromossomos. Análises de cinética de renaturação do DNA total revelam que em *T. cruzi*, cerca de 30% do genoma correspondem a seqüências de cópia única. O conteúdo de seqüências repetitivas é, portanto, relativamente alto (Lanar et al. 1981). Muitas seqüências repetitivas estão organizadas em tandem, isto é, as repetições aparecem dispostas uma após a outra de maneira regular.

2. DNA do cinetoplasto (kDNA)

Uma das principais características que distinguem os membros da ordem Kinetoplastidae, é a presença uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA, denominada de cinetoplasto, que se localiza numa região próxima ao ponto de inserção do flagelo e que está contida no interior da mitocôndria (Simpson 1987). No *T. cruzi* o kDNA representa cerca de 20-25% do DNA total da célula (Simpson 1987; Degraeve 1988). O kDNA está organizado de forma bastante peculiar, em uma rede estruturalmente constituída por 2 tipos de moléculas circulares (maxicírculos e minicírculos) concatenadas, que diferem em tamanho, número e função (Macina et al. 1986). As moléculas denominadas maxicírculos possuem tamanho variando entre 22-36 kb e número de cópias em torno de 50. Os genes das proteínas mitocondriais (citocromo oxidases, citocromo b, ATPases, NADHdesidrogenase) e dos rRNAs ribossômicos mitocondriais (rRNAs 9S e 12S) estão localizados no maxicírculo. Portanto, pode-se considerar o maxicírculo como sendo análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes (Simpson, 1987).

Os minicírculos possuem cerca de 1400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula. A população de minicírculos não é homogênea, ocorrendo variações na seqüência de nucleotídeos entre as moléculas componentes de uma rede. A rede de kDNA é formada por diferentes classes de moléculas de minicírculos e o número e tipos de classes podem variar entre as diferentes cepas ou isolados do parasita (Macina et al. 1985 e 1987).

Os minicírculos possuem 4 regiões altamente conservadas ("minirepeat") entre si, de 120 a 160 pb e que estão dispostas em ângulo de 90° uma em relação à outra. Essas regiões também são conservadas entre diferentes isolados do *T. cruzi*. Intercaladas às regiões constantes estão as regiões variáveis que têm um tamanho

de cerca de 280 a 320 pb (Degraeve et al. 1988). A variabilidade existente entre minicírculos pode ser detectada cortando-se o kDNA com enzimas de restrição e tem sido de grande utilidade em estudos de caracterização de cepas ou isolados de *T. cruzi*. As diferenças observadas nos padrões de restrição permitiram que isolados de *T. cruzi* fossem agrupados em esquizodemas (Morel et al. 1980, Avila et al. 1988, Sturm et al. 1989). A função dos minicírculos permaneceu desconhecida até a descoberta de RNAs "guia" envolvidos na editoração de transcritos de maxicírculos (Sturm & Simpson 1990; Pollard et al. 1990). Desta forma ficou claro que os minicírculos codificam a maior parte dos RNAs "guia" necessários para a editoração de RNAs mitocondriais. No processo de editoração de RNAs, resíduos de uridina são removidos ou adicionados aos transcritos primários resultando na formação de um mRNA cuja seqüência de nucleotídeos não é mais exatamente aquela codificada pelo gene.

3. Métodos de detecção de ácidos nucléicos utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas

3.1. Sondas moleculares

O desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico para a doença de Chagas, baseado nas experiências clássicas de hibridização de DNA empregando sondas moleculares específicas dirigidas contra alvos nucleares ou mitocondriais do *T. cruzi*, representou um grande avanço, pois poderia ser empregado em conjunto com os métodos parasitológicos de detecção do parasita, visando um aumento na sensibilidade e uma maior rapidez nas análises. Além disso, o desenvolvimento de sondas específicas possibilitaria não só a detecção do *T. cruzi* em amostras biológicas, como também a tipagem do parasita, fornecendo dados importantes sobre possíveis relações entre as cepas infectantes, assim como a ocorrência de infecções mistas.

A identificação de seqüências altamente repetitivas tanto a nível de DNA nuclear (Gonzalez et al. 1984; Ashall et al. 1988), quanto do kDNA (Morel,

Gonçalves & Simpson 1984), proporcionou o desenvolvimento de métodos de detecção específica do *T. cruzi*, através do uso destas seqüências como sondas em ensaios de hibridização. No entanto, para a detecção dos parasitas com fins de diagnósticos, nos casos de doença crônica (fase da doença caracterizada por baixa parasitemia), revelou-se pouco sensível (Santos 1987). O emprego de sondas moleculares para o diagnóstico da infecção causada pelo *T. cruzi*, teve melhor aplicação após o desenvolvimento da metodologia de amplificação enzimática do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O desenvolvimento da metodologia de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) marcou uma nova era nos ensaios diagnósticos baseados na detecção de DNA. Desde 1985 (Saiki et al.), quando foi descrita, inúmeras comunicações sobre várias aplicações da PCR têm sido relatadas na literatura científica. Esta metodologia tem mostrado grande aplicabilidade ao diagnóstico de diversas doenças humanas, tais como, doenças infecciosas, genéticas e câncer.

A técnica de PCR é um método de síntese enzimática de DNA "in vitro" que permite a amplificação exponencial de seqüências gênicas específicas, a partir de um DNA alvo. Utiliza-se uma DNA polimerase termo-estável de *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerase) e um par de iniciadores, ou seja, oligonucleotídeos complementares a sítios específicos localizados nas regiões adjacentes à região que será amplificada, em ambas as fitas de DNA. A mistura de reação contendo o DNA alvo ou molde, os iniciadores, a enzima *Taq* polimerase, um coquetel de nucleotídeos e tampão é submetida a vários ciclos térmicos sucessivos, nos quais as temperaturas de desnaturação, hibridização e extensão da fita complementar de alternam, ocorrendo o acúmulo exponencial da seqüência alvo. (Saiki et al. 1985 e 1988). Como cada seqüência sintetizada serve de matriz para síntese de nova fita de DNA complementar, o fator teórico de amplificação é de 2^n , onde n representa o número de ciclos de amplificação. Os produtos desta amplificação podem ser visualizados através de diferentes metodologias, que serão descritas mais adiante. Partindo-se de duas cópias da molécula alvo, 30 ciclos dão origem a 10^9 cópias.

Portanto, a técnica de PCR veio aumentar vertiginosamente a sensibilidade dos métodos de detecção de ácidos nucleicos em amostras clínicas, onde muitas vezes o agente infeccioso se encontra em quantidades muito reduzidas.

Em relação à aplicação da PCR no diagnóstico da doença de Chagas, tem sido descritos e utilizados vários iniciadores dirigidos a seqüências do kDNA (Sturm et al. 1989; Ávila et al. 1991 e 1993; Britto et al. 1993 e 1995; Wincker et al. 1994a, 1994b e 1997; Centurion-Lara et al. 1994; Junqueira et al. 1996; Gomes et al. 1998 e 1999), DNA nuclear (Moser et al. 1989; Diaz et al. 1992; Russomando et al. 1992 e 1998; Jones et al. 1993; Kirchhoff et al. 1996; Silber et al. 1997), ou rRNA do *T. cruzi* (Souto & Zingales 1993), apresentando resultados variáveis quanto à sua sensibilidade e ao seu poder diagnóstico.

3.2.1. Utilização de seqüências de kDNA como alvo

As seqüências conservadas repetidas 4 vezes por minicírculo do kDNA de *T. cruzi*, foram usadas como "alvo" para a reação em cadeia da polimerase, já que estas seqüências estão presentes em abundância no kDNA do parasita (80.000 cópias). A partir de análises comparativas das seqüências nucleotídicas de 20 "minirepeats" ou regiões conservadas do kDNA de *T. cruzi*, Degraeve et al. (1988) determinaram uma seqüência consenso que permitiu desenhar três duplas de iniciadores complementares aos blocos de seqüência altamente conservada. Sturm et al. 1989, empregaram estas três duplas de iniciadores complementares aos blocos de seqüência altamente conservada de minicírculos e obtiveram a amplificação de fragmentos de 83 pb (com S33A /S34A) e 122 pb (com S67/S34A) das regiões conservadas, e de 330 pb (com S35/S36) das regiões variáveis dos minicírculos presentes em amostras purificadas de kDNA. Estes fragmentos foram detectados em géis de agarose e de poliacrilamida ou em hibridizações em "dot blots" usando oligonucleotídeos complementares à seqüência interna amplificada, detectando até 10 moléculas de minicírculos, ou 0,1 % do kDNA de um único parasita. Não foram detectados produtos de amplificação com kDNA de outros protozoários da ordem kinetoplastida, como *T. rangeli*, *L. tarentolae*, *C. lucilliae*, *Blastococcrithidia* sp., *Endotrypanum* sp. e *Herpertomas* sp. No entanto, o kDNA de diferentes cepas ou isolados de *T. cruzi* (CL, Peru e Y) foram igualmente

amplificados, mostrando a possível utilização da metodologia para o diagnóstico da doença de Chagas.

Na busca do aprimoramento da amplificação do kDNA por PCR, com o objetivo de diagnóstico, Ávila et al. (1991) introduziram a utilização de dois reagentes importantes na preservação e processamento de amostras de sangue total. A solução de 6M de Guanidina-HCl/0,2M EDTA empregada como reagente de lise das células e preservação do DNA do parasita, facilita o transporte de amostras de sangue das regiões endêmicas para o laboratório, onde será analisado. O outro, o complexo cobre-fenantrolina, uma nuclease química, corta e lineariza o kDNA permitindo uma distribuição uniforme das moléculas alvo na solução de amostra, melhorando a sensibilidade do ensaio. Utilizando esta estratégia foi possível detectar 1 parasita em 20 ml de sangue total infectado. A pesquisa de *T. cruzi* no sangue de 5 pacientes chagásicos crônicos, dos quais somente um forneceu resultado positivo no xenodiagnóstico, mostrou-se positiva para todos eles pela técnica de PCR (Ávila et al. 1991). Além da detecção do parasita no sangue, também foi possível confirmar a sua presença em fezes de triatomíneos infectados e tecido cardíaco de camundongo infectado experimentalmente. Estes resultados iniciais eram promissores no sentido do teste ser aplicado para o diagnóstico da doença de Chagas.

Posteriormente, Ávila et al. (1993) aplicaram o método na detecção de *T. cruzi* em amostras de sangue de 114 indivíduos residentes na região endêmica de Virgem da Lapa, MG, utilizando os iniciadores específicos S35/S36 que amplificavam o fragmento de 330 pb contendo as regiões variáveis dos minicírculos do parasita (Sturm et al. 1989). Este fragmento foi detectado em gel de agarose e por hibridização após "Southern blot" com sonda específica (S67) para região a conservada dos minicírculos. O método mostrou uma sensibilidade de 100% quando comparado com testes sorológicos e com o teste de xenodiagnóstico. Os autores sugeriram a utilização do método no lugar do xenodiagnóstico e como teste confirmatório em triagem de bancos de sangue.

Britto et al. (1993) e Wincker et al. (1994) propuseram um protocolo simplificado, onde foi empregado um método de clivagem física para a rede de kDNA, através do aquecimento a 100° C por 5 min. do sangue total adicionado de guanidina/EDTA (GEB). Com este procedimento diminuiu-se a manipulação das

amostras de sangue, evitando-se possíveis contaminações .

Wincker et al. (1994) obtiveram resultados semelhantes aos de Ávila et al. (1993) em relação a sensibilidade (96,5%) analisando amostras de sangue de 100 indivíduos da mesma área endêmica .

Altos índices de correlação entre a detecção de kDNA de *T. cruzi* pela PCR e métodos sorológicos, foram relatados quando analisaram-se amostras de sangue de 45 crianças de uma região endêmica da Bolívia (índice de 93 %) (Wincker et al. 1994b) e de 91 indivíduos atendidos no Hospital Evandro Chagas, FIOCRUZ RJ (índice de 90 %) (Britto et al. 1995a). Neste último estudo também foi sugerida a aplicação da metodologia para avaliação e acompanhamento de pacientes após tratamento específico.

No entanto, níveis bem mais baixos de sensibilidade (45 % e 59%, respectivamente) foram obtidos quando amostras de sangue de indivíduos residentes em área endêmica do Sertão da Paraíba (Britto et al. 1995b) e do Sertão da Piauí (Junqueira et al. 1996) foram analisadas.

Uma nova abordagem para a PCR foi descrita por Centurion-Lara et al. 1994. Estes autores descreveram a quantificação da parasitemia de *T. cruzi* na infecção crônica experimental em camundongos. Foi empregada a técnica de PCR competitiva, utilizando um competidor construído por deleção de 50 pb a partir do amplicon de 330 pb obtido na amplificação do kDNA. Assim, o competidor consistia de um fragmento de 280 pb contendo nas suas extremidades seqüências complementares às seqüências dos iniciadores utilizados na detecção do kDNA, assim podendo ser amplificado na mesma reação de PCR. A quantificação é feita através da adição de quantidades diferentes e conhecidas do competidor a diferentes alíquotas do DNA alvo, preparadas a partir de uma mesma amostra clínica. Durante a amplificação, os iniciadores competem com dois alvos presentes na reação: o minicírculo do kDNA proveniente do parasita (presente na amostra clínica em quantidade desconhecida) e o competidor (presente em quantidade conhecida). Supondo que os 2 alvos sejam amplificados com a mesma eficiência, a quantificação da parasitemia pode ser feita através da determinação do ponto de equivalência, em que os dois amplicons de 330 pb e 280 pb estão presentes em quantidades iguais. Os autores determinaram o ponto de equivalência, comparando visualmente as bandas dos produtos amplificados no gel de agarose. Esta

metodologia parece promissora, entretanto, apenas 1 amostra de indivíduo chagásico foi analisada, necessitando de maiores avaliações.

Gomes et al. (1998), descreveram um procedimento de otimização da reação de PCR para a detecção de kDNA, onde foram feitas várias modificações no protocolo inicialmente sugerido (Britto et al. 1993 e Wincker et al. 1994), em relação a extração de DNA e condições da reação. Para confirmar a especificidade dos produtos amplificados foi feita hibridização com uma sonda específica após "slot blot" e a reação foi revelada pelo sistema de quimioluminescência. Esta sonda (# 119) é complementar à região conservada do minicírculo limiar à região variável. Com este novo protocolo conseguiu-se detectar 10 fg de DNA de *T. cruzi*, em gel de poliacrilamida a 6% corado com prata e de 0,1 fg após hibridização. Posteriormente, estes mesmos autores (Gomes et al. 1999), avaliaram o novo protocolo empregando amostras de sangue total de 113 indivíduos oriundos ou residentes de áreas endêmicas do Brasil e compararam os resultados com hemocultura, teste de lise mediada pelo complemento (LMCo) e testes sorológicos. A amplificação por PCR mostrou resultados positivos em 83,5% (66 de 79) de indivíduos com sorologia positiva, 47,6% (10 de 21) de indivíduos com sorologia negativa e 46,2% (6 de 13) de indivíduos com sorologia inconclusiva. O teste de LMCo mostrou resultados similares de 84,6%, 52,4% e 38,5% de positividade, respectivamente. Todas as 29 amostras com sorologia e hemocultura positivas, foram positivas na PCR, porém entre as 50 amostras com sorologia positiva e hemocultura negativa, 37 mostraram positividade na PCR e entre as 6 amostras com sorologia inconclusiva e hemocultura negativa, 2 foram positivas na PCR.

3.2.2. Utilização de seqüências de DNA nuclear como alvo

Moser et al. (1989), descreveram a possibilidade de adaptar a técnica de PCR na detecção do *T. cruzi*, empregando como alvo uma seqüência de 195 pb repetida 10^5 vezes no DNA nuclear, considerada a seqüência mais abundante do *T. cruzi* com características de DNA satélite dos eucariontes. Empregando iniciadores específicos (TCZ1/TCZ2) para a seqüência de 195 pb, foi obtido um fragmento de 188 pb com amostras de conteúdo intestinal e urina de triatomíneos infectados. Este fragmento de 188 pb não foi obtido com DNA de *Leishmania sp*, tripanossomas

africanos, bem como com DNA humano e murino. Os autores conseguiram detectar metade do conteúdo de DNA de um único parasita, em gel de agarose corado com brometo de etídio. Após "Southern blot" e hibridização com uma sonda interna marcada radioativamente, a sensibilidade aumentou para 1/200 do conteúdo de DNA de 1 parasita. Com estes mesmos iniciadores (TCZ1/TCZ2) Russomando et al. (1992), conseguiram amplificar pela PCR o fragmento de 188 pb a partir de DNA extraído de soros de pacientes chagásicos com infecção aguda e crônica. Resultados similares foram obtidos usando amostras de sangue total ou de soro e assim os autores sugeriram o emprego de amostras de soro ao invés de amostras de sangue total, nos estudos de campo, por não ser necessário nenhum tratamento químico nas amostras coletadas. Foram obtidos resultados positivos com todos os isolados de *T. cruzi* testados, provenientes do Paraguai. Os autores conseguiram detectar ¼ do conteúdo de DNA de um único parasita e sugeriram a possível utilização do ensaio no acompanhamento de pacientes chagásicos na fase aguda e em tratamento quimioterápico. Posteriormente, estes autores (Russomando et al. 1998), demonstraram que o ensaio de PCR empregando os iniciadores TCZ1/TCZ2 pode ser utilizado para a detecção precoce de fase aguda e para o acompanhamento de tratamento terapêutico de crianças nascidas de mães sorologicamente positivas para doença de Chagas. Cinquenta e oito crianças foram acompanhadas a partir do dia do nascimento, destas 6 apresentaram resultados positivos no PCR no 1º dia e apenas 2 delas foram positivas no teste de detecção direta do parasita por microscopia. O teste de PCR detectou a fase aguda mais precocemente do que o método de microscopia e/ou hemocultura.

Diaz et al. (1992), descreveram um método de amplificação de DNA satélite do *T. cruzi* pela PCR, empregando uma dupla de iniciadores complementares à região mais conservada dos elementos repetitivos de 195 pb presentes no DNA nuclear do *T. cruzi*. Estes autores analisaram o efeito do DNA humano em excesso na amostra e fizeram ensaios com concentrações crescentes. Desta forma, conseguiram amplificar 19 fg de DNA do parasita na presença de 15 µg de DNA humano (que corresponde à quantidade de DNA humano em 1 ml de sangue), obtendo um fragmento de aproximadamente 200 pb, visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os resultados demonstraram a possibilidade de detectar 1 parasita em 10 ml de sangue humano, obtendo sensibilidade 50 vezes

maior do que foi detectado por Moser et al. (1989).

Jones et al. (1993) utilizando os iniciadores específicos TCZ1/TCZ2 em ensaio de PCR demonstraram a presença de *T. cruzi*, ou de uma porção do seu genoma, nas lesões inflamatórias cardíacas de indivíduos com a doença de Chagas crônica fatal e sugeriram a possibilidade destas lesões estarem associadas com a persistência do parasita nos tecidos cardíacos desses pacientes. A sensibilidade do método foi determinada em ensaios de reconstituição, utilizando DNA extraído de tecido cardíaco de um indivíduo soronegativo, contendo diluições seriadas de formas epimastigotas de cultura. Uma alíquota contendo 1 μ l de cada diluição foi submetida a reação de PCR e após hibridização com sonda interna, pode ser detectado 1×10^{-4} do conteúdo de DNA de um único parasita.

Kirchhoff et al. (1996), compararam a sensibilidade de ensaios de PCR utilizando 2 pares de iniciadores já descritos na literatura: S35/S36 (Sturm et al. 1989) e TCZ1/TCZ2 (Moser et al. 1989) com o método de detecção direta do parasita por microscopia. Os autores também compararam 2 métodos de tratamento das amostras de sangue total: Guanidina/EDTA – fenantrolina (GEB-Ph) e SDS-proteinase K (SDS-pk). Para esta análise foram utilizadas amostras de sangue de camundongos infectados experimentalmente na fase aguda e crônica. Os resultados demonstraram que o ensaio de PCR empregando os iniciadores TCZ1/TCZ2 com amostras tratadas com SDS-pK foi mais sensível. Fazendo o acompanhamento dos camundongos pela detecção direta por microscopia e pela PCR, por 380 dias, a reação de PCR mostrou maior positividade. Estes autores chamaram atenção para o fato da reação de PCR ter mostrado resultado positivo antes do método de microscopia na fase aguda.

Silber et al. (1997), descreveram a utilização de um novo par de iniciadores (BP1/BP2), que hibridizam com uma seqüência de DNA nuclear, que codifica uma proteína flagelar F29, e que após amplificação por PCR produz um fragmento de 692 pb. Esta seqüência se apresenta arranjada em tandem em pelo menos 20 cópias e está localizada em cromossomos homólogos. A quantidade mínima de DNA de *T. cruzi* detectado foi de 10 fg (equivalente a cerca de 1/20 do genoma). Com este par de iniciadores foi possível amplificar DNA de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*. Não foi observada amplificação com DNA de *L. braziliensis*, porém empregando DNA de *T. rangeli* foi obtido um fragmento de 615 pb, que foi

diferenciado do fragmento de 692 pb em gel de poliacrilamida a 8%. Foram analisadas amostras de sangue de 65 indivíduos com sorologia positiva para a doença de Chagas, destes 62 mostraram positividade no PCR (sensibilidade >95%). Após "Southern blot" e hibridização, empregando como sonda o produto amplificado marcado com radioisótopo, as 3 amostras restantes foram detectadas (100% de sensibilidade).

4. Métodos de detecção de produtos amplificados por PCR

O método convencional de detecção de produtos de PCR tem sido a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio ou gel de poliacrilamida corado pela prata. Nestes métodos alíquotas dos amplicons são aplicadas no gel e submetidas à eletroforese, havendo a migração para o polo positivo. É utilizada uma mistura padrão com fragmentos de DNA de tamanho conhecido para se determinar o tamanho do fragmento detectado.

Várias outras técnicas têm sido desenvolvidas, para a detecção dos amplicons, com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a especificidade. Alguns sistemas de detecção de produtos amplificados utilizando sondas específicas marcadas têm sido propostas e estes têm mostrado além da especificidade, um aumento na sensibilidade. Diferentes reagentes têm sido empregados para a marcação das sondas (ex: radioisótopos, enzimas, substâncias fluorescentes e quimioluminescentes). As sondas marcadas com radioisótopos apresentam alta sensibilidade e especificidade, porém a desvantagem de ter que se trabalhar com radioatividade, tem contribuído para o desenvolvimento de outras marcações menos perigosas e que alcançam sensibilidade comparáveis àquelas obtidas com sondas radioativas.

Em muitos sistemas de detecção de produtos amplificados, têm sido empregadas membranas de nylon como suporte. Uma alíquota do amplicon pode ser diretamente adsorvida a membrana ("dot blot" e "slot blot") ou após eletroforese em gel de agarose, o DNA pode ser transferido para a membrana de nylon ("Southern blot"). Mesmo sendo extremamente específico e altamente sensível, estes métodos são trabalhosos, demorados e tecnicamente exigentes. Uma solução para estes problemas tem sido a utilização de placas de microtitulação como suporte.

Adicionalmente, ensaios com placas de microtitulação já ficaram comuns no laboratório clínico moderno, minimizando a necessidade de treino adicional para o pessoal do laboratório.

Uma nova abordagem que tem sido descrita é o sistema automatizado de detecção, *TaqMan*, onde é possível fazer a detecção e quantificação dos produtos amplificados durante a reação de PCR em tempo real (Livak 1995). O sistema foi desenvolvido com sondas fluorogênicas e utiliza a atividade 5' nuclease da *Taq*DNA polimerase, que cliva nucleotídeos de uma sonda hibridizada a uma sequência alvo na fita de DNA. Porém, o equipamento necessário para execução desta técnica ainda é muito caro.

4.1. Sistemas colorimétricos em placas de microtitulação

Vários sistemas de PCR-ELISA, onde diferentes estratégias são utilizadas para a captura do produto amplificado na placa de microtitulação, têm sido descritos (Landgraf et al. 1991, Oliveira et al. 1995, Qiao et al. 1995, Kox et al. 1996, Tang et al. 1998). Neste sistema o DNA amplificado pode ser capturado na placa de microtitulação por um oligonucleotídeo complementar, que é previamente adsorvido à superfície plástica. A detecção é acompanhada pela formação de um produto colorido, após a adição do conjugado enzimático e do respectivo substrato. O sistema apresenta vantagens em comparação com métodos convencionais: 1) Apresenta sensibilidade 10 a 100 x maior do que géis de agarose corados com brometo de etídio. 2) O emprego de sondas específicas para captura, promovem alta especificidade à detecção. 3) O formato de ELISA permite a análise de até 96 amostras simultaneamente, além de ser um teste simples, rápido e que reúne características para ser automatizado (Tang et al. 1998). A maioria dos laboratórios de rotina dispõe dos aparelhos necessários para a execução de um ELISA, enquanto o sistema de eletroforese em gel de agarose é restrito a laboratórios de biologia molecular.

Tendo em vista, a imensa potencialidade da tecnologia de amplificação gênica pela PCR e, por outro lado, a necessidade de maiores avaliações devido a variações de sensibilidade relatadas, este trabalho tem como objetivos:

- Avaliar o desempenho da técnica de PCR e compará-la a métodos sorológicos e ao xenodiagnóstico, utilizando a amostras clínicas de indivíduos residentes em área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG).
- Avaliar o emprego da PCR na avaliação de cura de indivíduos chagásicos submetidos à quimioterapia específica.
- Desenvolver e avaliar um ensaio colorimétrico (PCR-ELISA) para detectar e confirmar a especificidade de amplicons.
- Comparar o método de detecção de amplicons em gel de agarose com a detecção colorimétrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. População estudada

Foram analisadas amostras de soro e de sangue total de 85 indivíduos, 28 homens e 56 mulheres, com idade variando de 18 a 72 anos, residentes em área endêmica de doença de Chagas, no Município de Virgem da Lapa, Vale do Jequitinhonha, no nordeste de Minas Gerais. Estes indivíduos foram submetidos a exame clínico, raio X de tórax e eletrocardiograma, para identificação da forma clínica e, em parte destes, foi realizado o xenodiagnóstico. Para o xenodiagnóstico empregou-se 40 ninfas de *Triatoma infestans* de 3º e 4º estágios, de acordo com Cerisola, Rohwedder & Prado (1971), para verificar a presença de parasitas circulantes. Estes indivíduos fazem parte de um estudo longitudinal de acompanhamento clínico e laboratorial de cerca de 20 anos realizado, pelo Dr. José Borges Pereira do Departamento de Medicina Tropical da FIOCRUZ. Quatorze destes indivíduos eram comprovadamente chagásicos, sendo que 11 foram submetidos a tratamento com benzonidazol por 50-60 dias com doses diárias de 5 a 7,5 mg/kg de peso em 1987, e 3 indivíduos relataram já terem sido tratados. Todas as amostras clínicas utilizadas neste estudo foram coletadas na mesma ocasião em 1996.

2. Análises sorológicas

2.1. Imunofluorescência indireta (IFI)

Foi utilizada a técnica descrita por Camargo (1966), empregando formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, cultivadas a 28°C em meio de cultura LIT (Liver infusion triptose), como antígeno. Como conjugado, foi utilizada uma anti-IgG humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Cooper Biomedical Inc., Malvem, EUA), na diluição de 1/500. As amostras de soro foram testadas na diluição final de 1/40.

2.2. "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)

Foi utilizado o "kit" comercial BIOELISACRUZI (Biolab-Mérieux, Brasil) e foram seguidas as instruções do fabricante.

2.3- "Western blot" (WB).

Foi empregado a metodologia descrita por Teixeira et al. (1994). O antígeno citossólico obtido de formas epimastigotas de *T. cruzi*, da cepa Y, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e subseqüentemente foi feita a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose. As amostras de soro foram adicionadas a membrana na diluição de 1/100 e a reação foi revelada, adicionando-se o conjugado anti-IgG humana marcada com fosfatase alcalina (Sigma Chemicals Co; St. Louis, Missouri, EUA) e após incubação, o tampão de substrato (Tris-HCl 0,1M; MgCl₂ 0,005M; BCIP e NBT) para o desenvolvimento de cor. As amostras de soros foram consideradas positivas quando mostraram reatividade com pelo menos 3 bandas de um grupo de 7 bandas (14, 19, 27, 30, 34, 37 e 75 kDa).

2.4. "Line immunoassay" (LIA)

O "kit" comercial INNO-LIA Chagas AB (INNO-LIA) (Innogenetics N.V., Ghent, Bélgica) foi empregado seguindo-se as instruções do fabricante. Este "kit" consiste de 7 antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos biotinilados, adsorvidos a uma tira de membrana de nylon, através do sistema biotina - estreptoavidina. Além dos antígenos, as tiras contêm 3 bandas de controle da reatividade (alta, média e baixa) e 1 banda de estreptoavidina, para controle de "background". As amostras de soro foram adicionadas às tiras na diluição de 1/100 e mantidas à temperatura ambiente por 18 hs. A reação foi revelada com a adição do conjugado anti-IgG humana e subseqüentemente do substrato. A leitura da reação foi feita visualmente, comparando as intensidades de reação das bandas de antígenos com as bandas controle e os padrões de reatividade foram depois submetidos ao algoritmo estabelecido para o teste.

3. Procedimentos para a PCR

3.1- Extração de DNA

O volume de 10 ml de sangue periférico foi coletado de cada indivíduo e imediatamente misturado ao mesmo volume de uma solução de 6M de hidrocloreto de guanidina / 0,2M de EDTA (Sigma) pH 8,0 (Ávila et al 1991). A mistura (GEB – “guanidina-HCl/EDTA /blood”) permaneceu à temperatura ambiente durante a estadia na área endêmica e transporte até o laboratório, onde foi guardado a 4°C. Antes de se iniciar os procedimentos de extração do DNA, as amostras de GEB foram fervidas em banho de imersão a 100°C por 15 minutos, para promover a desintegração e assim possibilitar a distribuição homogênea da rede de kDNA (Britto et al 1993). Todas as amostras foram extraídas em duplicata, e eram processadas duas amostras de cada vez. A cada lote de seis amostras processadas eram incluídas: uma amostra negativa, para controle de contaminação por aerosol e uma amostra positiva, para controle do desempenho da extração. Foi seguido o protocolo descrito por Centurion-Lara et al (1994), com algumas modificações. Duas aliquotas de 200 µl de GEB foram misturadas com 200 µl de H₂O p.a. (diluyente de vacina de sarampo, fornecida por Biomanguinhos) e 400 µl da solução de fenol (GIBCO)/clorofórmio (Merck) (1:1) em tubo “Eppendorf”. Esta mistura foi homogeneizada por agitação e centrifugada a 14.000 rpm, em microcentrífuga, por cinco minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo e adicionou-se 400 µl de clorofórmio. Após nova homogeneização por agitação, foi feita uma centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos. A fase aquosa foi novamente coletada (desta vez mediu-se o volume obtido) e transferida para outro tubo e foram adicionadas de 40 µg de glicogênio (Sigma) e três volumes de 0,1M de acetato de sódio (NaOAc) (Sigma) em etanol a 95%. Após homogeneização, a precipitação foi feita centrifugando-se a 14.000 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o tubo “Eppendorf” contendo o sedimento foi colocado no bloco térmico a 60°C por 10 minutos com a tampa aberta para que qualquer resíduo de etanol fosse evaporado. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 50 µl de H₂O p.a. e mantido a -20°C.

3.2. Condições da PCR

Foi empregado um par de iniciadores complementares aos blocos de

seqüência conservada de minicírculos de kDNA de *T.cruzi* (Wincker et al 1994), sendo que um dos iniciadores contém uma molécula de biotina na sua extremidade 5':

121B -5'- Bio AAA TAA TGT ACG GG(G/T) GAG ATG CAT GA – 3'

122 - 5' GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA – 3'

Estes iniciadores amplificam as regiões variáveis do minicírculo, originando um fragmento de \cong 330 pb.

A amplificação foi feita com 5 μ l de amostra de DNA extraído ou purificado, que foi misturado a uma solução de amplificação contendo: 20mM Tris-HCl, pH 8,4 (GIBCO); 50 mM KCl (GIBCO); 3,75 mM de $MgCl_2$ (GIBCO); 980 μ M de dNTPs (245 μ M de cada) (Pharmacia); 0,8 u da enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase (GIBCO); 133 ng (15,5 pmoles) de cada iniciador (#121B e #122), para um volume final de 50 μ l. Todos os reagentes, com exceção da enzima foram distribuídos em pequenas alíquotas para serem descongeladas apenas uma vez. A reação foi imediatamente iniciada com os seguintes parâmetros: dois ciclos a 95°C por 30 minutos e 64°C por um minuto, 33 ciclos a 94°C por um minuto e 64°C por um minuto, e uma extensão final a 72°C por sete minutos. Em todas as reações foram incluídos os seguintes controles: um tubo sem amostra de DNA, uma amostra comprovadamente negativa e uma positiva. As duplicatas de DNA extraído de cada amostra eram testadas em paralelo. As que apresentavam resultado positivo em apenas uma das extrações, eram novamente analisadas em duplicata e caso o resultado se repetisse, estas amostras eram submetidas à nova extração. As amostras que apresentavam resultado negativo na duplicata, eram submetidas à amplificação do gene de β -globina humana, utilizando os iniciadores #PCO3 (5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3') e #PCO4 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'). (Saiki et al 1985), para verificar a possibilidade da presença de inibidores, e desta forma discriminar entre verdadeiros negativos e falsos negativos. A amplificação com estes iniciadores origina um produto de 110 pb. As concentrações e volumes da mistura para a amplificação do gene de β -globina humana foram as mesmas descritas para os iniciadores específicos para kDNA de *T.cruzi*, com exceção da solução de $MgCl_2$, que foi utilizada na concentração final de 4,5 mM e a enzima utilizada foi a *Taq* DNA Polymerase (GIBCO) na concentração de 1,6 unidades. As condições em relação aos ciclos também foram semelhantes, apenas ao invés de 33 ciclos, foram

utilizados 28 ciclos. As amplificações foram feitas no termociclador Gen Amp 2400 PCR (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn).

3.3. Detecção dos produtos amplificados em gel de agarose

Para visualizar os produtos amplificados, 10 μ l da amostra contida em cada tubo de reação foram misturados com 1 μ l de corante marcador de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xylene cyanol FF; 30% de glicerol) e aplicados em gel de agarose a 2% (SeaKem, FMC, Rockland, Maine). Para a montagem do gel e a corrida de eletroforese foi utilizado o tampão TBE 0.5X (50 mM Tris/45 mM Borato/0,5 mM EDTA, pH 8,0) (GIBCO). Após o final da corrida de eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) (Sigma) e examinado em um transiluminador com luz ultra violeta. Como marcador de peso molecular foi empregado a "100 Base-Pair Ladder" (GIBCO).

3.4. Detecção colorimétrica dos produtos amplificados (PCR-ELISA)

3.4.1. Sensibilização das placas de microtitulação com extravidina.

As condições de sensibilização foram estabelecidas após algumas etapas de padronização em que foram testadas diferentes concentrações de extravidina (5 μ g a 0,156 μ g/poço) e a reutilização da solução de extravidina na concentração de 1 μ g/poço. Estas análises foram feitas empregando-se o "pool positivo" e o "pool negativo". Estes "pools" foram preparados misturando produtos de amplificação de várias amostras negativas ("pool negativo") e positivas ("pool positivo"), assim obtendo uma quantidade suficiente de material amplificado para todas as etapas de padronização.

Placas de microtitulação de fundo plano (Nunc- Maxi sorp; Nunc, Inc., Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100 μ l, por cavidade, de solução de extravidina (SIGMA) na concentração de 10 μ g/ml, diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6. Após incubação de 24 hs, a solução de extravidina foi retirada e as placas foram lavadas 3x com solução salina tamponada (SST) (fosfato de sódio 0,01M; NaCl 0,15M, pH 7,2) acrescida de 0,05% de Tween 20 (SST/T) e mantidas a -20°C até o seu uso. A solução de extravidina a 10 μ g/ml foi utilizada 2 x para sensibilizar as placas de microtitulação.

3.4.2. Hibridização em solução

Os parâmetros de hibridização foram estabelecidos após a comparação de diferentes concentrações de sonda (20, 100 e 200 ng/5 µl de produto amplificado) e de temperatura (37°C e 55°C).

Os produtos amplificados foram hibridizados em solução com o oligonucleotídeo #119 DIG (5' TGG TTT TGG GAG GGG (C/G) (G/C) (T/G) TCA A(A/C)T TT 3') marcada com digoxigenina covalentemente ligada a extremidade 5'. Este oligonucleotídeo hibridiza com uma pequena porção da região conservada do fragmento de \approx 330 pb (Sturm et al 1989). O volume de 5 µl de produto amplificado foi hibridizado com 200 ng do oligonucleotídeo #119-DIG em um volume final de 100 µl de tampão de hibridização (solução salina citratada 6x, solução Denhardt's 1x (5g de Ficoll- type 100; 5g de PVP; 5g de BSA – fração V; qsp 500 ml de H₂O) e 50 µg/ml de DNA de esperma de salmão sonicado [type III sodium salt – Sigma]). Esta mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos e a seguir mantida por 1h e 30 minutos a 37°C.

3.4.3. Captura dos produtos amplificados hibridizados e detecção

O volume de 100 µl de cada produto amplificado hibridizado foi adicionado, em duplicata, às cavidades da placa de microtitulação, previamente sensibilizadas com extravidina. Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, foram feitas 6 lavagens com SST/T e adicionou-se 100 µl/poço de conjugado. Este anticorpo anti-digoxigenina marcado com peroxidase (Boehringer Mannheim, Alemanha), foi diluído a 1/3000 em SST/T acrescido de 2% de leite desnatado. Após incubação de 30 minutos a 37°C, as placas foram lavadas 8x como anteriormente descrito. Posteriormente, 100 µl do substrato foram adicionado a cada cavidade das placas e estas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, na ausência de luz. O substrato foi preparado no momento de uso da seguinte maneira: 100 µl de uma solução de 3',3',5',5' – tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) a 10 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e 20 µl de uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% foram adicionadas a 10 ml de tampão citrato fosfato 0,007 M pH 5,0 (citrato de sódio 0,1M, fosfato de sódio 0,2M). A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N e as absorbâncias foram determinadas a

450 nm em espectrofotômetro para placas de microtitulação (Bio-Rad). Os controles utilizados foram os "pools" positivo e negativo.

Para a análise dos resultados, o limite de discriminação de reatividade ("cut-off") foi estabelecido, utilizando o valor da média das absorbâncias dos controles negativos, mais 3 vezes o desvio padrão ($\bar{X}N+3SD$). Os resultados foram expressos pelo índice de reatividade (IR) que foi obtido da seguinte maneira: absorbância da amostra / absorbância do "cut-off". As amostras que apresentaram índice de reatividade no "cut-off" ou 10% acima ou abaixo foram consideradas indeterminadas.

Resultados

Para a análise dos resultados, os 85 indivíduos que fazem parte deste estudo foram divididos em 2 grupos: grupo I, indivíduos não chagásicos e chagásicos não tratados, com 71 indivíduos e grupo II, pacientes tratados, com 14 indivíduos. Nas tabelas 1 e 2 estão relacionadas as amostras dos indivíduos do grupo I e II, respectivamente, acompanhadas de seus dados pessoais (idade e sexo), clínicos e dos resultados dos exames laboratoriais. Os indivíduos grupo I foram classificados em não chagásicos (11 amostras) e chagásicos (60 amostras) em relação aos resultados da sorologia e do xenodiagnóstico e faziam parte deste grupo, 49 mulheres e 22 homens, com idade variando de 19 a 72 anos. Como pode ser observado na tabela 3, entre os pacientes chagásicos não tratados, 23 (38%) eram assintomáticos, isto é, não apresentavam manifestações clínicas, 22 (37%) apresentavam cardiopatia, cinco (8%) apresentavam manifestações digestivas e 10 (17%) apresentavam a forma mista, ou seja, além de cardiopatia também foi detectada manifestação digestiva. Trinta e dois destes pacientes foram submetidos ao xenodiagnóstico, e em 11 (34%) foi detectada a presença do parasita (Tabela 3).

O grupo de pacientes tratados foi composto de sete mulheres e sete homens, com idade variando de 18 a 52 anos. Entre estes sete eram assintomáticos, seis apresentavam a forma cardíaca e um a forma mista. Dez dos 11 indivíduos tratados em 1987, foram submetidos ao teste de xenodiagnóstico antes do tratamento, onde foi detectada a presença do parasita e um (# 705) relatou já ter apresentado o teste de xenodiagnóstico positivo anteriormente. Os outros três indivíduos relataram terem sido submetidos ao tratamento e a terem apresentado positividade no teste de xenodiagnóstico anterior ao tratamento. Todos os indivíduos tratados foram submetidos ao xenodiagnóstico, pelo menos, seis meses após o tratamento e em quatro foi novamente detectado parasitemia (Tabela 2).

Análise sorológica

Inicialmente, todas as 85 amostras de soros de indivíduos residentes na área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG), foram analisadas por 4 testes sorológicos. Os testes de IFI e ELISA são comumente utilizados na triagem de doadores em bancos de sangue e em laboratórios de rotina, e os testes de WB e LIA são testes alternativos empregados em laboratórios de pesquisa, principalmente no auxílio em casos de sorologia duvidosa, pois apresentam alta especificidade e custo elevado. Cinquenta e nove amostras de soros do grupo I (indivíduos não chagásicos e chagásicos não tratados) foram consideradas positivas, sendo que 58 mostraram resultados positivos nos quatro testes sorológicos e somente uma (# 1000) em 3 testes, sendo negativa apenas no teste de ELISA (Tabela 1). As 12 amostras restantes apresentaram resultados negativos nos 4 testes (Tabela 1). Treze amostras do grupo II (pacientes tratados) foram consideradas positivas, sendo que: nove mostraram resultados positivos em todos os testes sorológicos, duas foram positivas em 3 testes (uma negativa e a outra indeterminada no ELISA), uma (# 1176) mostrou resultados positivos apenas em 2 testes (positiva nos testes de WB/LIA e negativa nos testes de IFI/ELISA) e uma (# 705) foi positiva somente no teste de IFI, sendo considerada inconclusiva (Tabela 2).

Os resultados positivos obtidos no teste INNOLIA com as amostras de soros dos 2 grupos foram analisadas quanto a percentagem de positividade e intensidade de reatividade com cada um dos 7 antígenos que compõem este teste. Na tabela 4, podemos observar que houve uma maior percentagem de positividade com os antígenos Tc24, CRA, TcD, MAP e Ag39, variando de 93% a 100% e menor positividade com os antígenos FRA e SAPA, 50% e 75%, respectivamente. Na análise de intensidade de reatividade, foi observado que as amostras de soro apresentaram maiores percentuais de positividade (intensidade 3) com os antígenos Tc24, MAP e Ag39, 85%, 80,5% e 80,5%, respectivamente. Por outro lado, as amostras de soro apresentaram maiores percentuais de positividade com baixa reatividade (intensidade 0,5) com os antígenos FRA e SAPA, 36% e 57%, respectivamente. Já com os antígenos CRA e TcD, as amostras de soros apresentaram percentuais de positividade distribuídos entre as diferentes

intensidades de reatividade: alta, média e baixa (3; 2; 1 e 0,5).

Detecção dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose

As amostras de sangue dos 85 indivíduos foram submetidas à extração de DNA com fenol/clorofórmio e subsequentemente à PCR. Pela detecção visual em gel de agarose dos produtos amplificados, após coloração com brometo de etídeo, foi observado um fragmento de ≈ 330 bp. A intensidade da banda de 330 pb foi consistentemente fraca na maioria das amostras. Por isso, decidimos classificar os resultados positivos em 3 níveis, quanto a intensidade da banda de 330 pb: nível 1 – intensidade muito fraca, nível 2 – intensidade fraca e nível 3 – intensidade moderada a forte. Na figura 1, pode ser observada a detecção do produto de 330 pb nas intensidades 1, 2 e 3, sendo o resultado representativo das amostras analisadas.

Entre os pacientes chagásicos não tratados, em 66% das amostras (39 de 59) de sangue de pacientes sorologicamente positivos foi detectado o fragmento de 330 pb (tabela 5), sendo que em 19 amostras com intensidade 1, em 9 amostras com intensidade 2 e em 11 com intensidade 3 (tabela 1). Entre estas amostras estavam incluídas 8 que apresentaram xenodiagnóstico positivo e 12 que apresentaram xenodiagnóstico negativo (5 deles feitos em 1996). Duas amostras (# 48 e # 227) que apresentaram xenodiagnóstico positivo foram negativas na PCR, sendo que em uma delas o xeno foi feito em 1976 e a outra em 1996. A tabela 5, compara os resultados da PCR com os resultados do xenodiagnóstico e da sorologia para amostras de sangue do grupo I. Entre as amostras de sangue de indivíduos sorologicamente negativos, uma (# 2909) apresentou resultado positivo na PCR, porém esta não tinha sido submetida ao xenodiagnóstico. Uma outra amostra (# 107) foi positiva no xenodiagnóstico (feito em 1984) e negativa na PCR.

Em 8 amostras de sangue de pacientes tratados foi detectado o fragmento de 330 pb, sendo que, apenas 4 destas haviam apresentado positividade no xenodiagnóstico, após o tratamento (Tabela 6).

Deteccão colorimétrica dos produtos amplificados por PCR.

A figura 2 mostra a curva de padronização obtida com diluições seriadas de extravidina, variando a concentração de 5 μg a 0,156 μg /poço da placa de microtitulação, onde observamos uma queda na densidade óptica, mais acentuada a partir da concentração de 0,313 μg , quando foi empregado o "pool positivo". A concentração de 1 μg /poço foi escolhida para garantir uma boa saturação.

A figura 3, representa uma análise preliminar da sensibilidade da deteção colorimétrica do produto amplificado de 330pb, em comparação com a deteção no gel de agarose. Utilizando volumes diferentes do "pool positivo", a partir de 10 μl até 0,005 μl , observamos que em gel de agarose o fragmento de 330pb foi detectado até o volume de 1,25 μl e na deteção colorimétrica até o volume de 0,313 μl , ou seja, quatro vezes menos.

A figura 4, mostra etapas de padronização das condições de hibridização em relação a concentração de sonda, onde foram testadas as concentrações de 20, 100 e 200 ng/5 μl de produto amplificado e em relação a temperatura de hibridização a 37°C e 55°C. De acordo com estes resultados a concentração de sonda foi estabelecida a 200 ng/5 μl de produto amplificado e para a hibridização em solução a temperatura de 37°C, pois com algumas amostras positivas houve um acentuado aumento da densidade óptica nestas condições, sugerindo uma melhor hibridização.

Depois de estabelecidas as melhores condições os produtos da PCR das amostras de indivíduos do grupo não tratado e tratado foram submetidos à deteção colorimétrica (PCR-ELISA).

Entre os pacientes chagásicos não tratados, 58% das amostras (34 de 59) de sangue de pacientes sorologicamente positivos apresentaram índice de reatividade (IR) acima de 1,1 sendo consideradas positivas. Entre estas amostras estavam incluídas 6 que apresentaram xenodiagnóstico e deteção no gel positivos, 10 que apresentaram xenodiagnóstico negativo e deteção no gel positiva, 17 em que o xenodiagnóstico não foi determinado, mas apresentaram deteção no gel positiva e uma (# 1000, com IR de 1,3) que foi negativa no xenodiagnóstico e na deteção no gel. De duas amostras positivas no xenodiagnóstico e na deteção no gel; uma (#

116) foi negativa na detecção colorimétrica e a outra (# 39) não foi submetida a detecção colorimétrica. Uma outra amostra (# 2873) positiva na detecção no gel (intensidade 1) e xenodiagnóstico ND foi considerada negativa na detecção colorimétrica. Foram observados 5 resultados indeterminados (IR entre 0,9 e 1,1), incluindo uma amostra (# 257) que apresentou xenodiagnóstico negativo e detecção no gel positiva, uma (#2871) com xenodiagnóstico não realizado e positiva na detecção no gel (intensidade 1) e 3 (#873, #1435 e #1891) negativas na detecção no gel e xenodiagnóstico não realizado. A amostra # 107, que foi positiva no xenodiagnóstico (em 1984) e negativa na sorologia e na detecção em gel, foi considerada positiva na detecção colorimétrica.

Entre as 11 amostras de sangue de indivíduos não chagásicos, 4 foram consideradas positivas na detecção colorimétrica (com IR variando de 1,3 a 2,2), sendo que todas foram negativas na detecção em gel de agarose. Uma amostra (# 2909) que foi positiva apenas na detecção no gel (intensidade 1), foi negativa na detecção colorimétrica. Somente uma amostra (# 1477) foi considerada indeterminada, tendo esta apresentado resultado negativo no xenodiagnóstico e na detecção no gel (tabela 5).

Entre as 14 amostras de pacientes tratados, 7 foram consideradas positivas, sendo que, duas (# 617 e # 672) foram positivas no xenodiagnóstico e na detecção no gel, três (# 300, # 301 e # 1767) foram positivas na detecção no gel, mas foram negativas no xenodiagnóstico e duas (# 1500 e # 2019) foram negativas no xenodiagnóstico e na detecção no gel. Portanto, 2 amostras que haviam mostrado resultados negativos na detecção pelo gel, foram consideradas positivas na detecção colorimétrica. Cinco amostras de indivíduos tratados foram consideradas negativas na detecção colorimétrica, sendo que, uma (# 173) foi positiva no xenodiagnóstico e na detecção no gel (intensidade 1) e as outras 4 também foram negativas no xenodiagnóstico e na detecção no gel. Apenas uma amostra (# 705) foi considerada indeterminada, tendo esta apresentado resultado negativo no xenodiagnóstico e na detecção no gel (tabela 2).

Na figura 5, está mostrado em conjunto, alguns resultados da detecção no gel e a detecção colorimétrica, onde se pode observar alguns resultados discordantes.

Tabela 1. Identificação das amostras clínicas dos indivíduos do grupo I (não chagásicos e chagásicos não tratados), residentes na área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG) com seus respectivos dados pessoais, clínicos e laboratoriais.

Amostragem	Sexo ^a	Idade ^b	FC ^c	Sorologia ^d	Xenodiagnóstico ^e	PCR ^f	PCR-ELISA ^g
1477	M	34	A	N	-84	N	I(1,1)
1674	F	28	C	N	-88	N	N(0,7)
20	M	63	A	N	NR	N	N(0,5)
351	F	26	A	N	NR	N	P(1,3)
489	F	50	A	N	NR	N	N(0,7)
829	M	22	A	N	NR	N	P(1,5)
1190	F	47	C	N	NR	N	N(0,4)
1191	F	62	A	N	NR	N	P(1,6)
2869	M	19	A	N	NR	N	N(0,7)
2909	F	54	A	N	NR	P-1	N(0,5)
2914	F	57	A	N	NR	N	P(2,2)
107	F	36	A	N	+84/-85	N	P(1,5)
39	M	71	A	P	+84	P-1	NR
48	M	34	A	P	+76	N	N(0,5)
82	F	66	M	P	+90	P-2	P(4,8)
116	F	41	A	P	+84	P-1	N(0,7)
227	F	41	D	P	+96	N	N(0,5)
472	M	35	C	P	+95	P-2	P(2,1)
521	F	54	A	P	+84	P-3	P(7,2)
1343	F	46	A	P	+96	P-3	P(6,2)
1635	F	39	C	P	-90/+96	P-2	P(7,7)
2046	M	62	M	P	+95	P-3	P(5,5)
184	M	72	M	P	-86/-96	P-1	P(1,5)
257	F	51	C	P	-84	P-1	I(1,1)
776	M	55	C	P	-90	N	N(0,8)
892	M	22	A	P	-88/-89	P-1	P(2,8)
994	F	40	C	P	-90	P-1	P(2,5)
1000	F	58	A	P	-87/-96	N	P(1,3)
1177	F	43	A	P	-89	N	N(0,6)
1182	F	68	A	P	-84	N	N(0,5)
1212	M	54	D	P	-96	P-2	NR
1246	M	54	C	P	-96	N	N(0,7)
1441	F	54	A	P	-76/-82	N	N(0,5)
1513	F	63	A	P	-96	P-1	P(3,4)
1745	F	30	D	P	-88	N	N(0,8)
1844	F	36	C	P	-89/-90	P-2	P(1,3)
1855	F	64	C	P	-88	P-1	P(2,6)

Amostragem	Sexo ^a	Idade ^b	FC ^c	Sorologia ^d	Xenodiagnóstico ^e	PCR ^f	PCR-ELISA ^g
1896	F	65	C	P	-89	N	N(0,6)
1906	F	45	A	P	-90	P-1	P(3,6)
2089	F	57	C	P	-91	P-2	P(2,0)
2234	F	54	C	P	-92	N	N(0,3)
2585	M	54	C	P	-96	P-3	P(2,6)
2963	M	65	M	P	-96	P-1	P(1,2)
79	F	38	M	P	NR	P-1	P(2,3)
228	F	60	A	P	NR	N	N(0,4)
355	F	61	C	P	NR	P-3	P(12,1)
372	F	66	C	P	NR	P-3	P(14,4)
377	F	54	D	P	NR	P-1	P(1,8)
389	F	54	D	P	NR	P-2	P(4,3)
527	M	48	M	P	NR	P-3	P(4,8)
873	F	51	A	P	NR	N	I(0,9)
1040	F	55	M	P	NR	P-1	P(1,5)
1050	F	39	C	P	NR	P-1	P(1,4)
1060	F	47	C	P	NR	P-1	P(1,3)
1112	F	50	C	P	NR	N	N(0,6)
1137	F	50	C	P	NR	P-3	P(3,0)
1214	F	60	C	P	NR	N	N(0,3)
1221	M	48	A	P	NR	P-3	P(2,6)
1277	F	58	A	P	NR	P-1	P(1,3)
1435	F	56	A	P	NR	N	I(0,9)
1891	M	66	M	P	NR	N	I(1,0)
2226	M	35	M	P	NR	P-3	P(3,0)
2230	M	43	A	P	NR	N	N(0,8)
2564	F	52	M	P	NR	N	NR
2621	F	61	A	P	NR	P-2	P(1,7)
2625	M	40	A	P	NR	P-1	P(1,3)
2871	M	49	A	P	NR	P-1	I(0,9)
2873	F	45	C	P	NR	P-1	N(0,5)
2930	F	37	A	P	NR	N	N(0,4)
2884	F	43	C	P	NR	P-2	P(2,0)
2153	F	40	C	P	NR	P-3	P(1,6)

a - F, feminino; M, masculino.

b - idade em 1996.

c - FC - Forma clínica; A, assintomática; C, cardíaca; D, digestiva e M, mista.

d - N, negativo; P, positivo.

e - (+), positivo/ano de realização; (-), negativo/ano de realização; NR, não realizado

f - N, negativo; P-1, positivo com intensidade 1= muito fraca; P-2, positivo com intensidade 2 = fraca; p-3, positivo com intensidade 3= moderada a forte.

g - N, negativo; P, positivo; I, indeterminado; NR, não realizado.

Índice de reatividade = DO/CUT-OFF.

Tabela 2. Identificação das amostras clínicas dos pacientes tratados residentes na área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG) com seus respectivos dados pessoais, clínicos e laboratoriais.

Amostras ^a	Sexo ^b	Idade ^c	Forma Clínica ^d	Sorologia		Xenodiagnóstico ^e antes do tratamento	Xenodiagnóstico ^e depois do tratamento	PCR ^f	PCR- ELISA ^g
				IFI/ ELISA	WB/ LIA				
173 ¹	M	38	C	+/+	+/+	+ (85/86)	-87/+88/+91/ +95	P-1	N(0,7)
293 ¹	F	36	A	+/-	+/+	+ (76/82/86)	-87/+91/+95/ +96	P-2	NR
300 ¹	M	44	C	+/+	+/+	-86/+87	-88/89/90/96	P-2	P(1,7)
301 ¹	M	22	A	+/+	+/+	+84/-85/ -86/+87	-87/88/89/90/91	P-1	P(3,4)
617 ¹	M	30	C	+/+	+/+	+84	+87/-88/+89/ +90/+91/+95	P-1	P(1,2)
672 ¹	M	24	A	+/+	+/+	+84/-85/ -86/-87	-87/-88/-90/+96	P-1	P(1,2)
705 ¹	M	44	C	+/-	-/-	*	-88/-91/-96	P-1	I(1,0)
903 ¹	F	18	A	+/d	+/+	+81/85	-88/-90/-96	N	N(0,6)
1176 ¹	F	32	M	-/-	+/+	+76/-84	-88/-90/-96	N	N(0,8)
1500 ¹	F	52	A	+/+	+/+	+82/+85	-87/-88/-89/-90/ -91/-95/-96	N	P(1,9)
1767 ¹	F	36	A	+/+	+/+	+88	-89/-90/-96	P-2	P(1,4)
2019 ²	F	37	C	+/+	+/+	*	-96	N	P(1,3)
2861 ²	F	21	C	+/+	+/+	*	-96	N	N(0,6)
2887 ²	M	38	A	+/+	+/+	*	-96	N	N(0,7)

a - 1, amostras de indivíduos tratados em 1987; 2, amostras de indivíduos que relataram tratamento antes de 1996.

b - F, feminino; M, masculino.

c - idade em 1996.

d - A, assintomática; C, cardíaca; M, mista.

e - (+), positivo/ano de realização; (-), negativo/ano de realização; * relato de xenodiagnóstico positivo.

f - N, negativo; P-1, positivo com intensidade 1= muito fraca; P-2, positivo com intensidade 2 = fraca.

g - N, negativo; P, positivo; I, indeterminado; NR, não realizado.

Índice de reatividade = DO/CUT-OFF.

Tabela 3. Distribuição das formas clínicas e resultados de xenodiagnóstico entre os pacientes chagásicos não tratados, residentes na área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG).

Sorologia	Nº de amostras clínicas	Forma ^a clínica				Xenodiagnóstico ^b		
		A	C	D	M	+	-	NR
Positiva	59	22	22	5	10	10	21	28
Negativa	1	1	0	0	0	1	0	0
Total	60	23	22	5	10	11	21	28

a - A, assintomática; C, Cardíaca; D, digestiva; M, mista.

b - NR, não realizado.

Tabela 4. Análise da porcentagem de positividade e intensidade de reação com cada antígeno do INNOLIA. Amostras de soro positivas de pacientes chagásicos tratados (13) e não tratados (59), residentes em área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG).

Antígeno	Total de amostras	Intensidade				
		4	3	2	1	0,5
Tc24	72 (100%)	0	61 (85%)	5 (7%)	6 (8%)	0
CRA	67 (93%)	0	22 (30%)	11 (16%)	21 (29%)	13 (18%)
FRA	36 (50%)	0	1 (1,4%)	2 (2,6%)	7 (10%)	26 (36%)
TcD	67 (93%)	0	18 (25%)	14 (19,5%)	19 (26,5%)	16 (22%)
MAP	71 (98%)	4 (5,5%)	58 (80,5%)	3 (4%)	4 (5,5%)	2 (2,5%)
SAPA	54 (75%)	0	1 (1,4%)	2 (2,7%)	10 (13,9%)	41 (57%)
Ag39	72 (100%)	3 (4%)	58 (80,5%)	2 (2,7%)	8 (11,4%)	1 (1,4%)

Tabela 5. Comparação de resultados do PCR, obtidos com a detecção em gel de agarose e pela detecção colorimétrica (PCR-ELISA), com os resultados da sorologia e xenodiagnóstico com as amostras de soro e sangue total de indivíduos não chagásicos e chagásicos não tratados, residentes em área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG).

Sorologia positiva	Nº de amostras	PCR		PCR-ELISA ^a			
		+	-	+	-	I	NR
Xeno +	10	8	2	6	3	0	1
Xeno -	21	12	9	11	8	1	1
Xeno NR	28	19	9	17	6	4	1
Total	59	39 (66%)	20	34 (58%)	17	5	3
Sorologia Negativa							
Xeno +	1	0	1	1	0	0	0
Xeno -	2	0	2	0	1	1	0
Xeno NR	9	1	8	4	5	0	0
Total	12	1	11	5	6	1	0
Total	71	40	31	39	23	6	3

a- I, indeterminado; NR, não realizado

Tabela 6. Comparação de resultados do PCR, obtidos com a detecção em gel de agarose e detecção colorimétrica (PCR-ELISA), com os resultados do xenodiagnóstico com as amostras de soro e sangue total de pacientes tratados, residentes em área endêmica de doença de Chagas (Virgem da Lapa, MG).

Xeno Pós tratamento	Nº de amostras	PCR-ELISA ^a				Pos	Neg	Detecção no gel
		Pos	Neg	Ind	NR			
Positivo	4	2	1	0	1	Pos	Detecção no gel	
		0	0	0	0	Neg		
Negativo	10	3	0	1	0	Pos	Detecção no gel	
		2	4	0	0	Neg		
Total	14	7	5	1	1			

a- Ind, indeterminado; NR, não realizado

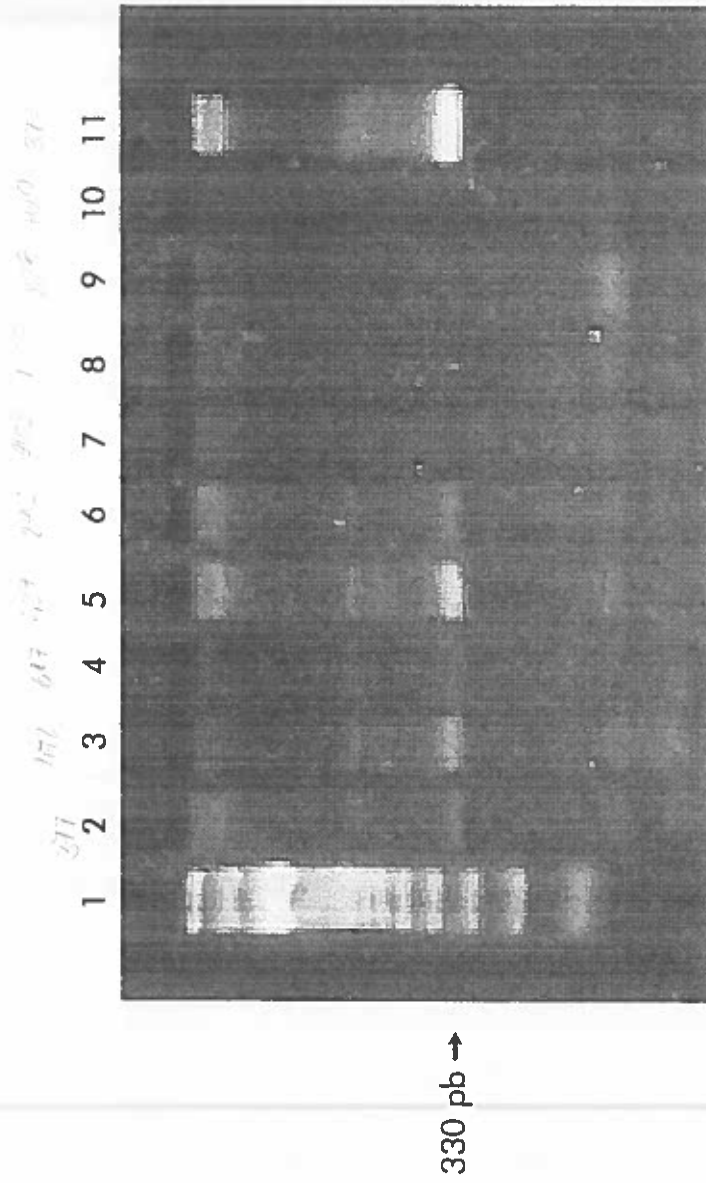


Figura 1. Detecção dos produtos amplificados por PCR. 10 μ l de reações de PCR foram analisadas em gel de agarose a 2%, após coloração com brometo de etídeo. Resultado representativo de amostras de indivíduos residentes na área endêmica de doença de Chagas, Virgem da Lapa, MG, Linha 1, padrão 100 pb ladder, Linhas 2,4,6 amostras positivas com intensidade 1; Linha 3, amostras positivas com intensidade 2; Linha 5, amostra positiva com intensidade 3; Linhas 7 e 9 amostras negativas; Linha 10, controle negativo e Linha 11, controle positivo.

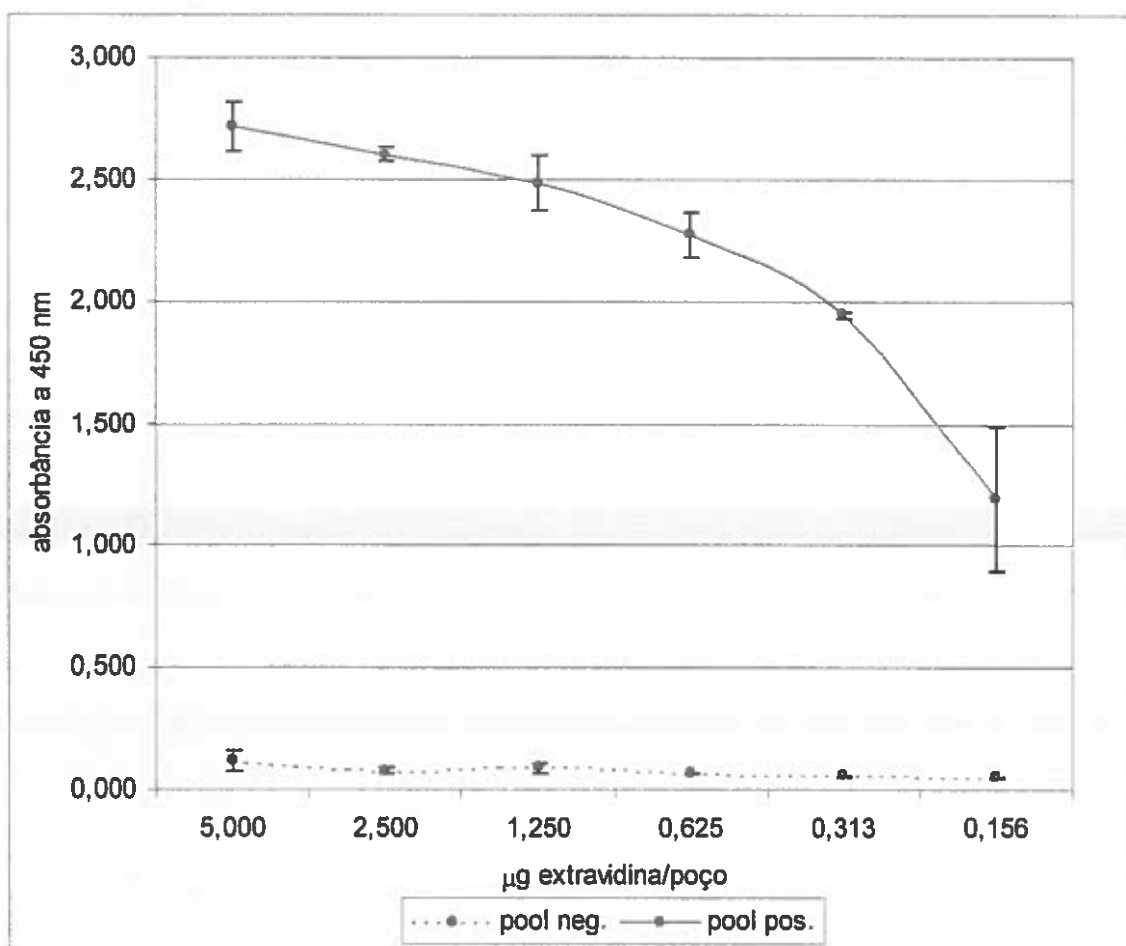


Figura 1 - Padronização da concentração de extravidina utilizada para a sensibilização da placa de microtitulação. As placas foram sensibilizadas com 100 µl/poço de diluições seriadas de extravidina em concentrações de 50,0 µg a 1,56 µg/ml em tampão bicarbonato pH 9,6. 5 µl de produtos dos "pools" positivo e negativo foram hibridizados com 20 ng da sonda #119-dig em 100 µl de tampão de hibridização a 55°C e capturados em triplicata nas placas a temperatura ambiente por 15 minutos. Os híbridos capturados foram detectados através da incubação com conjugado anti-digoxigenina -HRP, seguida da revelação com TMB/H₂O₂. O gráfico mostra a média de três valores.

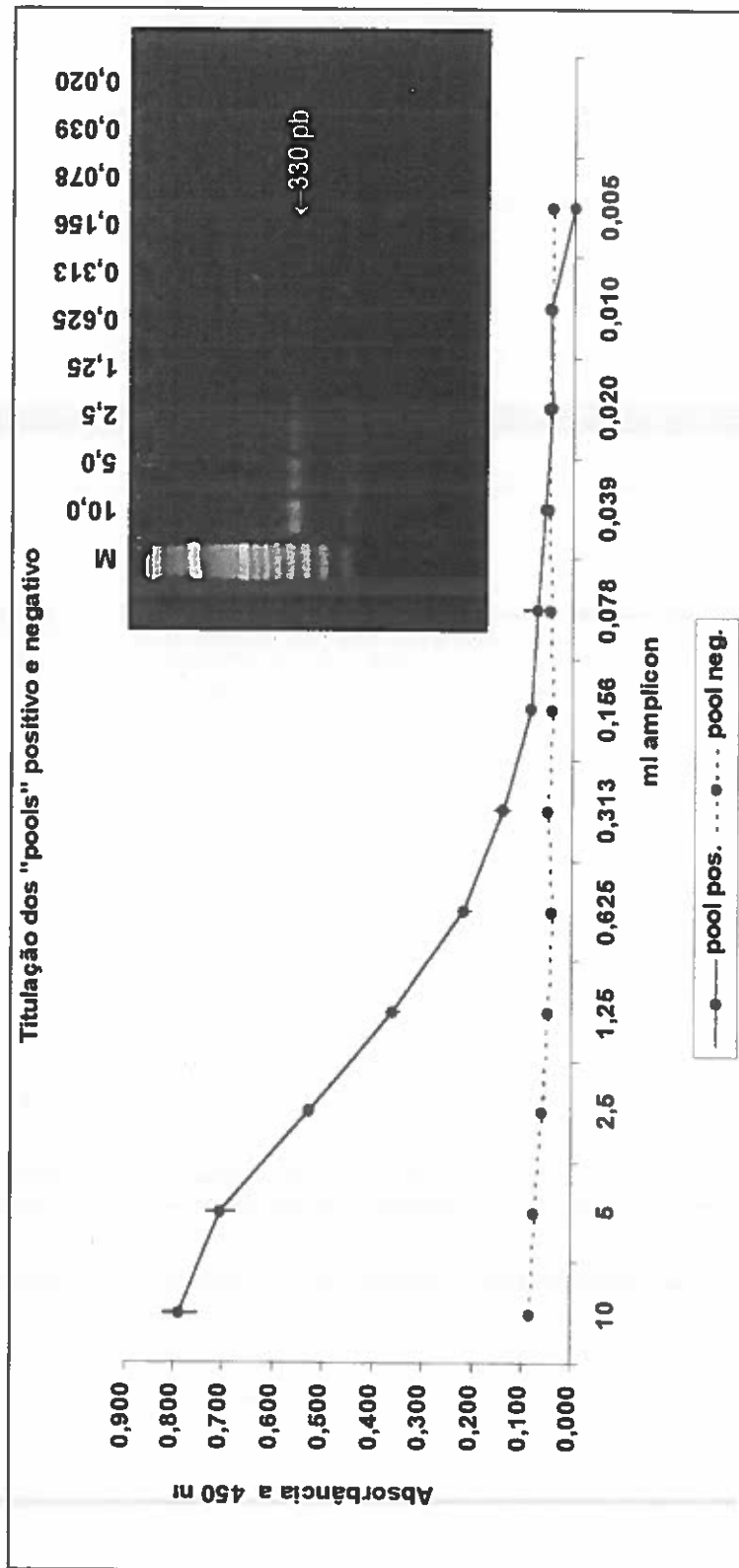


Figura 1 - Análise da sensibilidade da detecção de produtos amplificados em gel de agarose e pela detecção colorimétrica (PCR-ELISA). 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078; 0,039 e 0,020 μ l de reações de PCR positivas e negativas ("pool" positivo e "pool" negativo, vide Material e Métodos) foram analisados em gel de agarose a 2% e em placas sensibilizadas com estreptoavidina a 1 μ g/poço. Antes da captura na placa, os diferentes volumes das reações foram hibridizados a 55°C com 40 ng da sonda #199-DIG por 10,0 μ l da reação em 100 μ l de tampão de hibridização. Os híbridos capturas foram detectados através de incubação com conjugado anti-digoxigenina-HRP, seguida pela revelação com TMB/H₂O₂ e posterior parada da reação com 2N H₂SO₄.

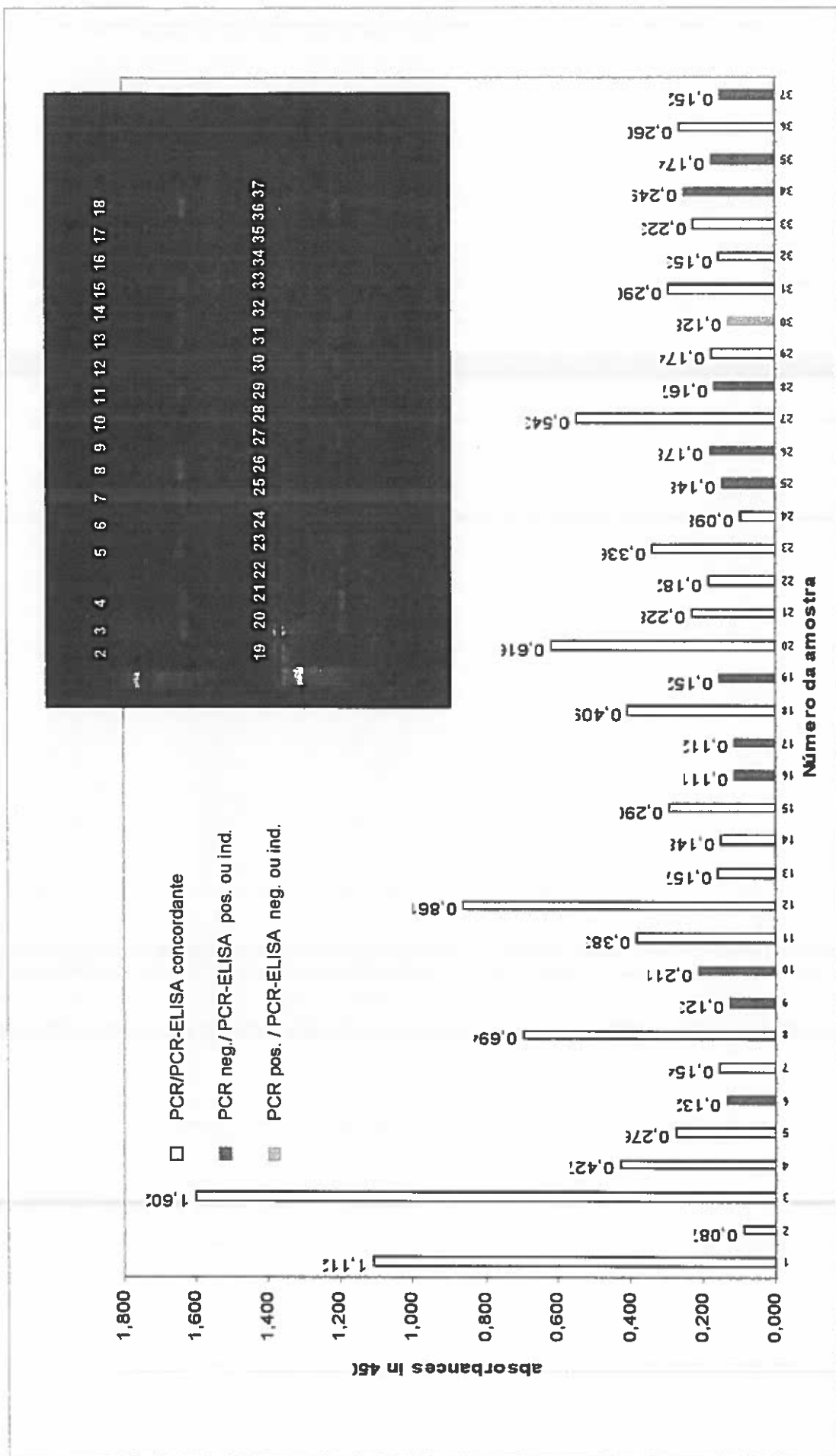


Figura 3 – Detecção de produtos de amplificação obtidos de amostras de indivíduos residentes em Virgem da Lapa/MG, área endêmica para a doença de Chagas.

Legenda p/ Figura 5

Figura 5 – Detecção de produtos de amplificação obtidos de amostras de indivíduos residentes em Virgem da Lapa/MG, área endêmica para a doença de Chagas. 5 µl dos produtos foram analisados tanto em gel de agarose a 2% quanto no PCR-ELISA. Para a detecção colorimétrica, os produtos foram hibridizados com 200 ng da sonda #199-dig em 100 µl de tampão de hibridização a 37°C e em seguida adicionados à placa sensibilizada com estreptoavidina a 1 µg/poço. Os híbridos capturas foram detectados através de incubação com conjugado anti-digoxigenina-HRP, seguida pela revelação com TMB/H₂O₂ e posterior parada da reação com 2N H₂SO₄.

Os números consecutivos no gel e no gráfico correspondem às seguintes amostras:

1*	"pool" positivo*	14	#1844	27	#82
2	"pool" negativo	15	#1855	28	#107
3	#372	16	#1435	29	#184
4	#1040	17	#1891	30	#257
5	#994	18	#1906	31	#2585
6	#873	19	#2019	32	#2625
7	#1277	20	#2046	33	#2884
8	#1343	21	#2089	34	#2914
9	#1477	22	#2153	35	#829
10	#1500	23	#2226	36	#79
11	#1513	24	#2230	37	#351
12	#1635	25	#1000		
13	#1767	26	#1191		

* O "pool" positivo que corresponde ao número 1 no gráfico não foi aplicado no gel.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve início com a análise sorológica de 85 amostras que foram divididas em dois grupos: grupo I, indivíduos não chagásicos e chagásicos não tratados com 71 amostras e grupo tratado com 14 amostras. A análise sorológica foi feita com quatro testes, sendo dois altamente sensíveis, a IFI e o ELISA, utilizados em triagem de doadores em bancos de sangue e em laboratórios de rotina, e os outros 2, WB e LIA, altamente específicos, utilizados em laboratórios de pesquisa, principalmente no auxílio diagnóstico em casos de sorologia duvidosa. Nestes testes são empregados diferentes antígenos: no teste de IFI é empregado o parasita íntegro; no ELISA e no WB extrato solúvel de formas epimastigotas e no LIA, sete antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos. Portanto, diferenças em relação a sensibilidade e especificidade podem ser observadas. Na nossa análise houve uma elevada concordância de resultados (94%) entre os quatro testes. Na IFI houve discordância apenas em relação ao resultado de duas amostras de soro (# 705, 1176), sendo a amostra #705 negativa nos demais testes e positiva na IFI e a amostra #1176 positiva no WB/LIA e negativa na IFI/ELISA. Porém, estas amostras de soro pertencem a pacientes tratados e devemos levar em consideração que os resultados negativos podem ser efeito do tratamento. Já no ELISA houve discordância de resultados em quatro amostras, uma (#1000) de um paciente chagásico não tratado que foi negativa apenas neste teste e três de pacientes tratados, sendo uma negativa (#293) e uma duvidosa (#903) apenas no ELISA e a outra negativa (#1176) na IFI/ELISA e positiva no WB/LIA. Mais uma vez, estes resultados negativos ou duvidosos podem ser resultado do tratamento.

Na triagem de doadores em bancos de sangue da América do Sul freqüentemente tem sido adotado a utilização de três testes sorológicos, sendo considerado positiva a amostra de soro que foi reativa com pelo menos dois testes (WHO 1991). Adotando este critério, 59 amostras do grupo I e 13 do grupo II foram considerados positivas, 12 amostras do grupo I foram consideradas negativas, porém uma (#107) apresentou positividade no xenodiagnóstico, sendo este indivíduo considerado chagásico. Uma amostra de soro do grupo II foi considerada inconclusiva.

Em relação ao teste INNOLIA, onde são empregados sete antígenos bem definidos, foi feita uma análise da percentagem de positividade e da intensidade de reação com cada antígeno. Foi observado maior positividade com os antígenos Tc24, CRA, TcD, MAP e Ag39 e menor com os antígenos FRA e SAPA e a intensidade de reação foi mais alta com os antígenos Tc24, MAP e Ag39 (em torno de 80% com intensidade 3) e mais baixa com os antígenos FRA e SAPA (36% e 57%, respectivamente, com intensidade 0,5). A baixa reatividade com o antígeno SAPA já era esperada, sendo ele um antígeno relacionado com a fase aguda da doença (Affranchino et al. 1989, Reyes et al. 1990), e a população de indivíduos chagásicos analisada neste estudo eram todos da fase crônica da doença.

Na análise de correlação entre a forma clínica dos pacientes chagásicos não tratados e os resultados da sorologia, foi observado que 62% (37 de 59) das amostras de soros que apresentaram resultado positivo eram de indivíduos que apresentavam manifestações clínicas, sendo que houve predominância de forma cardíaca (37%) sobre a forma digestiva (8%) e a forma mista (17%). Borges-Pereira (1997) descreveu a ocorrência de manifestações severas em indivíduos de Virgem da Lapa, com predomínio da forma cardíaca e digestiva (37,5% e 7,5%, respectivamente).

O xenodiagnóstico apresentou 32% (10 de 31 amostras) de sensibilidade em relação aos indivíduos com resultados da sorologia positivos. Em um estudo epidemiológico, Borges-Pereira (1997) detectou 35 % de xenopositividade em indivíduos sorologicamente positivos de Virgem da Lapa.

A detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* é o método de eleição para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas na fase crônica. Além da facilidade de execução, os testes sorológicos fornecem informações de valor diagnóstico em prazos curtos e hoje já dispomos de testes com alta sensibilidade e especificidade. Uma das principais aplicações do diagnóstico sorológico está na triagem de doadores em bancos de sangue com o objetivo de prevenir a transmissão por transfusão sanguínea. Contudo, é um método de detecção indireta, ou seja, detecta-se anticorpos que reagem com antígenos do parasita e não a presença do parasita. Em algumas situações, tais como, quando os resultados da sorologia são duvidosos e para avaliações de tratamento quimioterápico, os métodos de detecção do parasita ou de seus componentes são de primordial importância. Os métodos de detecção do parasita na fase crônica, xenodiagnóstico e hemocultura, além de serem de difícil execução, fornecem resultados em prazos longos. A sensibilidade destes

métodos tem apresentado níveis baixos, em função não só da metodologia como também, da característica da infecção crônica, que apresenta níveis baixos de parasitemia. Devido a isto, nos últimos anos tem-se procurado estabelecer métodos de detecção de fragmentos gênicos do parasita através da técnica de PCR. Os primeiros relatos do uso da PCR no diagnóstico da infecção chagásica crônica mostrou uma sensibilidade variando de 90% a 100% (Ávila et al. 1993, Wincker et al. 1994). Posteriormente, níveis de sensibilidade bem inferiores foram observados de 45% e 59% (Britto et al. 1995 e Junqueira et al. 1996) demonstrando a necessidade de maiores avaliações.

Portanto, foi objetivo deste estudo avaliar a sensibilidade da metodologia de PCR em comparação com testes sorológicos utilizando algumas amostras de sangue provenientes de pacientes com o xenodiagnóstico realizado. Os protocolos empregados para a PCR foram aqueles correntemente descritos na literatura (Wincker et al. 1994, Centurion et al. 1994). Algumas modificações foram feitas, como por exemplo no método de extração de DNA das amostras de GEB e nas condições de reação a fim de aumentar a sua sensibilidade. Quando avaliada entre o grupo de indivíduos não tratados, com sorologia positiva, a PCR apresentou uma sensibilidade de 66% (39 de 59). Analisando os resultados de 31 amostras de soro de indivíduos deste mesmo grupo que foram submetidos ao xenodiagnóstico, o mesmo índice de sensibilidade na PCR foi observado (64%), ou seja, mais alta do que aquela determinada pelo xenodiagnóstico. O elevado índice de positividade da PCR tem sido relatada por vários autores (Ávila et al. 1993, Wincker et al. 1994, Britto et al. 1995, Junqueira et al. 1996, Gomes et al. 1999), empregando os mesmos iniciadores. Porém, Ávila et al. (1993) e Wincker et al. (1994), observaram níveis mais altos de sensibilidade analisando amostras da mesma região de nosso estudo (Virgem da Lapa). No entanto, esses autores descreveram níveis de xenopositividade mais altos (50% e 42%, respectivamente) do que no nosso estudo. Este fato pode ter contribuído para observação de elevado nível de positividade na PCR. Posteriormente, Britto et al. (1995) e Junqueira et al. (1996) avaliando a mesma metodologia com amostras de outras regiões endêmicas do Brasil (Paraíba e Piauí), observaram níveis mais baixos de sensibilidade (de 45% e 59%) em correlação com níveis mais baixos de xenopositividade (13% e 35%). Gomes et al. (1999), otimizaram a PCR e obtiveram 83,5% de sensibilidade quando analisaram amostras de indivíduos com sorologia positiva, oriundos de regiões endêmicas do Brasil, mas que residiam no Sul do país, sendo que neste estudo não foi realizado o xenodiagnóstico.

Entre os indivíduos não chagásicos, observamos que uma amostra (#2909), apresentou resultado positivo na PCR. A possibilidade de contaminação desta amostra foi descartada através da utilização de salas separadas para a extração de DNA, preparo da solução de reação e de detecção dos produtos e, também da utilização de amostras negativas como controles, tanto na extração como na reação. Como este indivíduo não foi submetido ao xenodiagnóstico e não apresentava manifestação clínica são necessárias maiores investigações para esclarecer este caso.

Gomes et al. (1999) observaram 47,6% de positividade na PCR em indivíduos com sorologia negativa e em grande parte destes (80%) o teste de LMCo foi positivo. Os autores afirmaram a possibilidade desses indivíduos serem positivos. Existem relatos na literatura (Luquetti 1987, Camargo 1992) de alguns pacientes chagásicos crônicos que apresentam o teste de xenodiagnóstico positivo e a sorologia consistentemente negativa, mas não nessa proporção.

Entre os pacientes chagásicos não tratados, observamos que duas amostras que apresentaram sorologia e xenodiagnóstico positivos foram negativas na PCR. Em uma delas (#48) o resultado do xenodiagnóstico é de 20 anos atrás, portanto, é necessário fazer um novo exame paralelamente a uma nova coleta de amostra para a PCR, para se chegar a uma conclusão deste caso. Já na outra amostra (#227) o xenodiagnóstico foi feito na mesma ocasião (1996) da coleta da amostra para PCR e só podemos concluir que na amostra de sangue coletada não continha nenhum parasita, decorrente da baixa parasitemia, e pode perfeitamente ser possível a detecção em uma nova coleta.

Entre os pacientes tratados oito apresentaram resultado positivo na PCR, sendo que todos apresentaram resultado de xenodiagnóstico positivo antes do tratamento e apenas quatro após o tratamento. Portanto, a PCR mostrou um melhor desempenho para a avaliação da eficácia do tratamento. As seis amostras que foram negativas na PCR, também foram negativas no xenodiagnóstico feito na mesma ocasião, sendo assim este fato sugere de que o tratamento foi eficaz nestes indivíduos, mas outras análises devem ser feitas para se confirmar esta observação.

Outro objetivo deste estudo, foi desenvolver uma metodologia de detecção de produtos amplificados por PCR, por colorimetria (PCR-ELISA) e verificar a sua especificidade. Esta metodologia de detecção já é utilizada no diagnóstico de várias outras doenças infecciosas (Landgraf et al. 1991, Oliveira et al. 1995, Qiao et al. 1995, Kox et al. 1996) e apresenta vantagens em relação ao método convencional de detecção em gel de

agarose, tais como, o emprego de sondas específicas para a captura, o que fornece um alto grau de especificidade na detecção dos produtos amplificados, além de permitir a análise de até 96 amostras simultaneamente. O teste é simples e rápido e reúne características para ser automatizado (Tang et al. 1998).

Após algumas etapas de padronização do PCR-ELISA, foram estabelecidas as condições para analisar os produtos de amplificação das 85 amostras de GEB.

No grupo I (indivíduos não chagásicos e chagásicos não tratados) foram observados 58% (34 de 59) de resultados positivos entre as amostras sorologicamente positivas e 41% (5 de 12) entre as amostras sorologicamente negativas. Entre as amostras com PCR-ELISA/sorologia positivas, apenas em uma (#1000) não foi detectado visualmente o produto de 330 pb e a IR foi de 1,3. Por outro lado, as amostras com PCR-ELISA positiva/sorologia negativa, foram todas negativas na detecção visual no gel.

No grupo de pacientes tratados sete amostras foram positivas no PCR-ELISA, sendo que duas foram negativas na detecção visual no gel.

Devido a intensidade da banda de 330 pb ter sido consistentemente fraca na maioria das amostras PCR positiva, foi decidido classificá-las em três níveis, para compará-las com a IR obtida na detecção colorimétrica. De um modo geral houve uma forte correlação entre as técnicas, ou seja, a maioria dos resultados que apresentavam na detecção em gel intensidade igual a um, a IR também foi baixa, com apenas algumas exceções, que podem ter ocorrido em função do grau de hibridização com a sonda #119-Dig. As quatro amostras que foram PCRpositvas/PCR-ELISAnegativos, apresentaram intensidade de banda muito fraca na detecção no gel e as sete amostras que apresentaram resultado indeterminado no PCR-ELISA, foram negativas (4) ou positivas (3) com intensidade igual a um. Estas amostras além de apresentarem um conteúdo de kDNA muito baixo podem não ter hibridizado adequadamente com a sonda #119-Dig. Já as seis amostras que foram PCR negativo/PCR-ELISA positivo, apresentaram IR entre 2,2 e 1,3, isto é, uma baixa reatividade. Estas amostras são extremamente fracas, ou seja, abaixo do limite de detecção pelo gel, mas que hibridizaram bem com a sonda e por isso foram detectadas no sistema PCR-ELISA.

Um total de 19 resultados discordantes foram obtidos entre os dois métodos de detecção na análise das amostras de indivíduos não tratados e tratados. Considerando, que foram obtidos mais resultados PCR negativo/PCR-ELISA positivo (oito) do que PCR positivo/PCR-ELISA negativo (quatro), esses dados nos permite concluir que a detecção

colorimétrica (PCR-ELISA) é um método viável e promissor, mas que ainda precisa ser melhorado. A sonda (#119-Dig) é complementar a uma seqüência da região constante do minicírculo limiar a região variável, e talvez não consiga detectar todas os produtos de 330 pb. Assim, pretendemos dar continuidade a este trabalho utilizando, inicialmente uma sonda de kDNA total.

Portanto, até o momento só podemos confirmar observações já descritas na literatura, como:

- A reação em cadeia da polimerase mostrou ser mais sensível (64%) do que o teste de xenodiagnóstico (32%), para a detecção direta do *T. cruzi* no sangue de pacientes chagásicos crônicos, porém não atinge a sensibilidade dos métodos sorológicos.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- Affranchino JL, Ibañez C, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Ashlund L, Petterson V & Frasch ACC 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 MA, Carvalho MR, Oelemann W & Goldenberg S 1990. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 85: 513-517.
- Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS & Rodrigues VLCC 1994. Acidentes com *T. cruzi* em laboratório de pesquisa em doença de Chagas. Apresentação de 5 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 27 (supl II): 145-146.
- Almeida IC, Covas DT, Soussumi LMT. & Travassos LR 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 37: 850-857.
- Almeida JO & Siqueira AF 1960. Estudo da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação de complemento no sistema moléstia de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2: 204-212.
- Almeida JO & Fife Jr EH 1976. Métodos de fijación del complemento estandarizado cuantitativamente para la evaluación crítica de antígenos preparados con *Trypanosoma cruzi*. *Org Pan de La Salud Sci Publ* No 319, Washington, DC.
- Andrade, Z 1999. Patologia da doença de Chagas p.201- 230 In Brener, Z., Andrade, Z. & Barral-Neto M (eds), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Araujo FG & Guptill D 1984. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 33: 362-371.

- Araujo FG & Tighe L 1984. Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Evidence that the 90 KDa protective glycoprotein antigen is expressed in Blood-form trypomastigotes and may not be functional in dead epimastigotes. *J Parasitol* 70: 185-187.
- Araujo FG 1985. A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigen-coated nitrocellulose paper strips. *Am J Trop Med Hyg* 34: 242-245.
- Araujo FG 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies to related trypanosomatids. *Infect Immun* 53: 179-185.
- Araujo FG, Chiari E & Dias JC P 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet* 31: 246-249.
- Araújo FG, Heilman B & Tighe L 1984. Antigens of *Trypanosoma cruzi* detected by different classes and subclasses of antibodies. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 78: 672-677.
- Ashall F, Yip-Chuck DAM, Luquetti AO & Miles MA 1988. Radiolabeled Total Parasite DNA Probe Specifically Detects *Trypanosoma cruzi* in Mammalian Blood. *J Clin Microbiol* 26: 576-578.
- Ávila HA, Gonsalves AM, Nehme NC, Morel CM & Simpson L 1988. 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.
- Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC & Simpson L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-222.
- Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva E, Degraeve W, Morel CM & Simpson L 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426.
- Barreto MP 1979. Epidemiologia, p 89-151. In Brener Z & Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- Borges-Pereira J 1997. *Doença de Chagas humana: Estudo da infecção crônica, morbidade e mortalidade em Virgem da Lapa, MG, Brasil (1976-1996)*. PhD thesis, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 197 pp.
- Borges-Pereira J & Coura JR 1987. Morbidade da Doença de Chagas em populações urbanas do Sertão da Paraíba. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 101-107.
- Borges-Pereira J, Willcox HPF & Coura JR 1987. Imunofluorescência indireta na infecção chagásica crônica . II – Emprego das cepas Y, 12-SF e Colombiana como antígenos. *Rev da Soc Bras Med Trop*: 20 (suppl II): 49.
- Borges-Pereira J, Santos RCR , Lemos ERL . Cruz MLS, Subia CEA , Willcox HPF & Cunha RV 1989. Infecção chagásica em menores de treze anos no município de Virgem da Lapa, Minas Gerais. Estudo longitudinal no período de seis anos. *Rev Soc Bras Méd Trop* 22 (suppl. II): 124.
- Brener Z 1977. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct features. *PAHO, Sc Publ* 347: 11-21.
- Brener Z 1979. O parasita. Relações hospedeiro-parasita, p.1- 41. In Brener, Z. & Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Breniere FS, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre L, Antezana, G & Philippe, D 1984. Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*, *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26: 254-258.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, & Morel CM 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 88: 171-172.
- Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pimez C, Morel CM & Wincker P 1995a. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241-247.

- Britto C, Cardoso MA, Santoro A, Borges-Pereira J, Coura JR, Morel CM, Wincker P. 1995b. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 81: 462-71.
- Brumpt E. 1914. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, a tripanosomose de Chagas. *An Paul Med Cirurg* 13: 97-102.
- Burns Jr, JM, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ & Reed SG 1992. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci* 89: 1239-1243.
- Camargo ME 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 227- 234.
- Camargo ME 1992. Serological diagnosis: an appraisal of Chagas disease serodiagnosis, p.165-178. In Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo.
- Camargo ME & Rebonato C 1969. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 18: 500-505.
- Camargo ME & Takeda GKF 1979. Diagnóstico de laboratório. p.175-198 In: Brener, Z. & Andrade, Z. (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Macedo V, Peres BA & Castro C 1977. Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação, em 3.624 soros. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19: 254-260.
- Camargo ME, Ferreira AW, Peres B A, Previato LM & Scharfstein J 1986. *Trypanosoma cruzi* antibodies. *Meth Enz Anal* 11: 368-381.

- Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Souza JMP, Carvalheiro JR, Yanovsky JF & Guimarães MCS 1986. Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal. *PAHO Bull* 20: 233-244.
- Cano MI, Gruber A, Vasquez M, Cortes A, Levin MJ Gonzalez A, Requema JM & Franco da Silveira J 1995. *Trypanosoma cruzi* genome project: Molecular Karyotype of clone CL Brener. *Mol Biochem Parasitol* 71: 273-278.
- Carbonetto CH, Malchiodi EL, Chiaramonte M & Durante De Isola E 1990. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* antigen by affinity chromatography with a monoclonal antibody. Preliminary evaluation of its possible applications in serological tests. *Clin Exp Immunol* 82: 93-96.
- Carvalho MR, Krieger MA, Almeida EC, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquézar A, Dorhiac-Llacer PE, Chamone DF & Goldenberg S 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33: 830-834.
- Centurion-Lara A, Barrett L, & van Voorhis WC 1994. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 170: 1334-1339.
- Cerisola JA, Chaben MF & Lazzari JO 1962. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Pren Med Argent* 44: 1761-1762.
- Cerisola JA, Rohwelder R & Prado CE 1971. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. *Bol Chil Parasitol* 26: 57.
- Cetron MS, Hoff R, Kahn S, Eisen H & van Voorhis WC 1992. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *T. cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. *Acta Trop* 50: 259-266.
- Chagas C 1909. Nova tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

- Chiari, E & Brener, Z 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 134-138
- Chiari E 1992. Diagnostic tests for Chagas disease, p. 153-164. In S Wendel, Z Brener, ME Camargo & A Rassi (eds), *Chagas Disease (American and Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, ISBT. São Paulo.
- Chiari E, Dias JCP, Lana M, & Chiari CA 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23.
- Chiller TM, Samudio MA & Zoulek G 1990. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 43: 650-656.
- Corral R, Montemayor A, Freilij H & Grinstein S 1984. Detection of specific circulating immunocomplexes formed by immunoglobulin M in acute *Trypanosoma cruzi* infection in man. *IRCS. Medical Science*, 12: 949-950.
- Corral RS, Altcheh J, Alexandre SR, Grinstein S, Freilij HL & Katzin AM 1996. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 34: 1957-1962.
- Cotrim PC, Paranhos GS, Mortara RA, Wanderley J, Rassi A, Camargo ME & Silveira JF 1990. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J Clin Microbiol* 28: 519-524.
- Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF & Petana W 1991. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where transmission has been interrupted – Iguatama and Pains, west Minas Gerais State, Brasil, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 395-398.
- Coura JR, Barrett TV, & Naranjo MA 1994. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: Uma nova forma de transmissão da infecção chagásica ? *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 251-253.

- Coura JR, Willcox HPF, Arboleda Naranjo M, Fernandes O, & de Paiva DD 1995. Chagas Disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study (1). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 415-420.
- Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, de Castro JAF, da Cunha RV, Costa W & Junqueira ACV 1996a. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 197-205.
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, & Campbell D 1996b. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 278-279.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N & Kalil J 1996. Autoimmunity in Chagas' disease-identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98: 1709-1712.
- Degraive WM, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM 1988. Peculiar sequence organisation of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 27: 63-70
- Dias JCP 1979. Mecanismos de transmissão, p.152-174. In Brener, Z. & Andrade, Z. (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Dias JCP 1987. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitol Today* 3: 336-341.
- Dias JCP 1992. Epidemiology of of Chagas' disease, p.49-80. In Wendel S, Brener, ME, Camargo E & Rassi A (eds). *Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. Internacional Society of Blood Transfusion, São Paulo, Brasil.
- Dias JCP 1999. Epidemiologia, p.48-74. In Brener, Z., Andrade. Z. & Barral-Neto M (eds), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

- Dias JCP & Schofield CJ 1999. The evaluation of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(suppl. I): 103-121.
- Diaz C, Nussenzweig V & Gonzalez A 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 46: 616-623.
- Engman DM, Reddy LV, Donelson JE & Kirchhoff LV 1987. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra- strain heterogeneity in karyotype and chromosomal gene location. *Mol Biochem Parasitol* 22: 115-123.
- Ferreira AW & Moraes de Avila SL 1995. Laboratory diagnosis of Chagas' heart disease. *São Paulo Medical Journal/RPM* 113: 767-771.
- Ferreira AW, Belem ZR, Moura MEG & Camargo ME 1991. Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 123-128.
- Fife Jr EH & Mushel LH 1959. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol* 101: 540-543.
- Frasch ACC & Reyes MB 1990. Diagnosis of Chagas' disease using recombinant DNA technology. *Parasitol Today* 6: 137-139.
- Freilij ML, Corral RS, Katzin AM & Grinstein S 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 25: 133-137.
- Gazzinelli RT, Galvão LM, Krautz G, Lima PC, Cançado JR, Scharfstein J & Krettli AU 1993. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 49: 625-635.
- 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: 2082-2085.

- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SDJ, Galvao LMC & Chiari E 1998. *Trypanosoma cruzi*. Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28-33.
- Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ & Chiari E 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60: 205-210.
- 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 N, Galindo I, Guevara P, Novak E, Scorza JV, Añez N, Franco da Silveira J & Ramirez JL 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J Clin Microbiol* 32: 153-158.
- Grant IH, Gold JWH, Wittnee M, Tanowitz MB, Natan C, Mayer K, Reich L., Wollner N, Steiner L, Ghavimi F, O'Reilly RJ & Armstrong D 1989. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. *Ann Intern Med* 111: 849-851.
- Gruber A & Zingales B 1993. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 76: 1-12.
- Guerreiro C & Machado A 1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med* 27: 225-226.
- Hamerschlak N, Pasternak J, Amato Neto V, de Carvalho MB, Guerra CS, Coscina AL, Ferreira OC, Rosenblit J, & Szterling L N 1997. Chagas disease: an algorithm for donor screening and positive donor counseling. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 205-209.
- Henriksson J, Aslund L, Macina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo Jj, Frasch ACC & Pettersson U 1990. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 42: 213-224.

- Hoff R, Mott KE, Silva JF, Menezes V, Hoff JN, Barret TV & Sherlock I 1979. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 28:461-466.
- Hoft DF, Donelson JE, & Kirchhoff LV 1995. Repetitive protein antigens of *Trypanosoma cruzi* have diverse intracellular locations. *J Parasitol* 81: 549-54.
- Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser DR, Yost WJ, Blumin JH, Donelson JE & Kirchhoff LV 1989. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 57: 1959-1967.
- Hoshino-Shimizu S, Camargo ME & Umezawa ES 1975. A rapid slide flocculation test for the diagnosis using *Trypanosoma cruzi* fragments preserved by lyophilization. *Am J Trop Med Hyg* 24: 586-589.
- Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Shimizu T & Nagasse TK 1982. A study on the reproducibility of a stable lyophilized reagent for the Chagas' disease hemagglutination test: proposals for quality control analysis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 24: 63-68.
- Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YAW, Leiby DA, Badaro R & Reed SG 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: 1226-1234.
- Hubsch RM, Chiechie N, Comach G, Rangel Aldao R & Gusmão R 1988. El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I - Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *T. cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 277-285.
- Hungerer KD, Enders B & Zwisler O 1970. Recent developments in immunodiagnosis of Chagas' disease. *J Parasit* 56: 429.
- Ibañez CF, Affranchino JL & Frasch ACC 1987. Antigenic determinants of *T. cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol Biochem Parasitol* 25: 175-184.

- Ibañez CF, Affranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Petterson U & Frasch ACC 1988. Multiple *T. cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol* 30: 27-34.
- Israelski DM, Sadler R & Araujo FG 1988. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 445-455.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL & McCurley TL 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-57.
- Junqueira ACV, Chiari E, & Wincker P 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-132.
- Kahn T, Corral R, Freilij H & Grinstein S 1983. Detection of circulating immunocomplexes, antigens and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in human *Trypanosoma cruzi* infection. *IRCS Med Sci* 11: 670-671.
- Katzin AM, Marcipar A, Freilij H, Corral R & Yanovsky JF 1989. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. *Exp Parasitol* 68: 208-215.
- Kerner N, Liégeard P, Levin MJ, & Hontebeyrie-Joskowicz M 1991. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp Parasitol* 73: 451-459.
- Kierszenbaum F 1996. Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. *Parasitol Today* 12: 414-415.
- Kierszenbaum F 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12: 210-223.
- Kirchhoff LV 1993. American trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* 329: 639-644.

- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, & Moser DR. 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 34: 1171-1175.
- Kloetzel JK, Camargo ME & Giovannini VL 1975. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 22: 259-261.
- Knecher L M, Rojkin LF, Capriotti GA, & Lorenzo LE 1993. Chagas disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int J Parasitol* 24: 207-211.
- Kox LFF, Noordhoek GT, Kunakorn M, Mulder S, Sterrenburg MS & Kolk AHJ 1996. Microwell hybridization assay for detection of PCR products from *Mycobacterium smegmatis* strain 1008 used as an internal control. *J Clin Microbiol* 34: 2117-2120.
- Krautz GM, Coutinho MG, Galvão LMC, Cançado JR & Kretzli AU 1994. Antígenos solúveis liberados por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste de ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. *Rev Soc Brás Méd Trop* 27: 199-207.
- Kretzli AU & Brener Z 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol* 128: 2009-2012.
- Kretzli AU, Cançado JR & Brener Z 1982. Effect of specific chemotherapy on the level of lytic antibodies in Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 334-340.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR & Goldenberg S 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427-434.
- Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padron T, De 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.
- Lanar DE & Manning JE 1984. Major surface proteins and antigens of the different "in vivo" and "in vitro" forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 11: 119-131.
- Lanar DE, Levy SC & Manning JE 1981. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 3: 327-341.

- Landgraf A, Reckmann B & Pingoud A 1991. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal. Biochem.* 198: 86-91.
- Laranja FS, Dias E, Nobrega GC & Miranda A 1956. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.
- Lemesre JL, Afchain D, Orosco O, Loyens M, Breniere FS, Desjeux P, Carlier Y, Martin U, Nogueira JA, Le Ray D & Capron A 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *T. cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 35: 86-93.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijaman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Kagan A, Rosenbaum MB, Torres HN & Segura EL 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 41: 530-538.
- Lissaldo AM, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES & Stolf AMS 1994. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to dot-ELISA. *Rev Inst Med São Paulo* 36: 163-166.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methos Appl* 4: 357-362.
- 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: 44-49.
- Lorca M, Child R, Garcia A, Silva M, Martinez L, Jerez G, Toledo I, Mazzano D. 1994. Evaluation of commercial kits used for Chagas disease diagnosis in blood banks in Chile. II. Routine application. *Rev Med Chil* 122: 925-931.
- Luquetti AO 1987. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goian Med* 33: 1-16.

- Luqueti AO 1990. Use of *T. cruzi* defined proteins for diagnosis-Multicentre trial serological and technical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 497-505.
- Luqueti AO & Rassi A 1999. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, p.344-378. In Brener Z, Andrade, Z & Barral-Neto M (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, & Krettlí AU 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 143-148.
- Mac Daniel JP, Dvorak JA 1993. Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol* 57: 213-222.
- Macina RA, Sanchez DO, Affranchino JC, Engel J & Frasch ACC 1985. Polymorphism within minicircle sequence classes in the kDNA of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 16: 61-74.
- Macina RA, Sanchez D, Gluschkof D, Burrone O & Frasch A C C 1986. Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 21: 25-32.
- Macina RA, Arauzo S, Reyes MB, Sanchez DO, Basombrio MA, Montamat EE, Solari A & Frasch ACC 1987. *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Mol Biochem Parasitol* 25: 45-53.
- Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW & Marni RA 1994. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*: use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag16386). *Clin Exp Immunol* 97: 417-423.
- Martins MS, Hudson L, Krettlí AU, Cançado JR & Brener Z 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Exp Immunol* 61:343-350.

- Martins-Filho AO, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado JR & Brener Z 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2: 569-573.
- Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, da Silva AM, Mota I, Heredia RAG, Luquetti AO & Leser PG 1997. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 35: 1829-1834.
- Miles MA, Lanham SM, De Souza AA & Povoá MM 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma* and their evaluation for strain identification. *Trans R Trop Med Hyg* 74: 221-237.
- Miles MA, Cibulskis RE, Morel CM, Deane MP & Gonçalves AM 1986. The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 2: 94-101.
- Minter-Goedbloed E, Minter DM & Marshall TFC 1978. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in experimental and natural chronic infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 217-225.
- Moncayo A 1992. Chagas' disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *Wld Hlth Statist Quart* 45: 276-279.
- Moncayo A 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 401-404.
- Morel CM, Chiari E, Mattei DM, Romanha AJ & Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814.
- Morel CM, Gonçalves AM & Simpson A 1984. Recent advances in the development of DNA hybridization probes for the detection and characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 51-53.
- Morgado MG, Ivo-Dos Santos J, Pinho RT, Argüelles E, Rezende JM & Galvão-Castro B 1989. *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 309-314.

- Moser DR, Kirchhoff LV, & Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482.
- Muniz J & Freitas G 1944. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem Ins. Oswaldo Cruz* 41: 303-333.
- Nery-Guimarães F, Lage HA, Venâncio IA & Grynberg NF 1969. Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, leishmanioses tegumentares e calazar com vários antígenos de "*Leishmania*" e "*Trypanosoma*". *O Hospital* 75: 299-313.
- Nickerson P, Orr P, Schroeder MC, Sekla L & Johnston JB 1989. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic area. *Ann Intern Med* 111: 851-854.
- Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeliss J & Cohn Z 1981. *Trypanosoma cruzi*. Surface antigens of blood and culture forms. *J Exp Med* 153: 629-639.
- Norris KA, Harth G & So M 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect Immun* 57: 2372-2377.
- O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V & Rodrigues MB 1994. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Trop* 56: 265-287.
- Oelemann W M R, Teixeira M G M, Costa GCV, Peralta JM, Borges Pereira J, Castro J A F & Coura JR. 1996. Chagas disease serology. Reactivity classification of serum panels obtained in four different areas in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91(suppl): 262.
- Oliveira DA, Holloway BP, Durigon EL, Collins WE & Lal AA 1995. Polymerase chain reaction and a liquid-phase nonisotopic hybridization for species-specific and sensitive detection of malaria infection. *Am J Trop Med Hyg* 52: 139-144.
- Pan AA, Rosenberg GB, Hurley MK, Schock GJH, Chu VP & Aiyappa A 1992. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J Infect Dis* 165: 585-588.

- Paranhos-Bacalla GS, Santos MRM, Cotrim PC, Rassi A, Jolivet M, Camargo ME & Franco da Silveira J 1994. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol* 16: 165-169
- Pastini AC, Iglesias SR, Carricarte VC, Guerin ME, Sánchez DO & Frasch ACC 1994. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. *Clin Chem* 40: 1893-1894.
- Peralta JM, Teixeira MGM, Shreffler WG, Borges-Pereira J, Burns 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.
- Pereira JB, Willcox HPF & Coura JR 1985. Morbidade da doença de Chagas. Estudo longitudinal de seis anos, Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 63-71.
- Pollard VW, Rohrer SP, Michelotti EF, Hancock K & Hajduk SL 1990. Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 63: 783-790.
- Prata A, Mayrink W, Sodre AG & Almeida JO 1975. Discrepâncias relativas entre resultados de reações de Guerreiro-Machado executadas em três diferentes laboratórios. *Rev Pat Trop* 4: 35-38.
- Primavera KSC, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME & Hoshino-Shimizu S 1990. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies in acute and different chronic forms of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32: 172-180.
- Qiao Z, Miles MA & Wilson SM 1995. Detection of parasites of the *Leishmania donovani*-complex by a polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA). *Parasitology* 110: 269-275.
- Rabello A, Luquetti AO, Moreira EF, Gadelha MF, Santos JÁ, Melo L & Schwind P 1999. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay – ID-PaGIA Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:77-82

- Rangel-Aldao R, Comach G, Allende O, Cayama E, Delgado V, Piras R, Piras M, Henriquez D & Negri S 1986. *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 20: 25-32.
- Rassi A, Amato Neto V & Siqueira AF 1969. Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento na fase crônica da moléstia de Chagas. *Rev Inst Trop São Paulo* 11: 430-435.
- Rassi A, Rassi Junior A & Rassi GG 1999. Fase aguda. p.231- 245. In Brener Z, Andrade, Z & Barral-Neto, M (eds), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reiche EMV, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI & Jankevicius JV 1998. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59: 750-756.
- Renart J, Reiser J & Stark GR 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera-method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci*, 76: 3116.
- Reyes MB, Lorca M, Munoz P & Frasch ACC 1990. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci* 87: 2846-2850.
- Rezende JM & Moreira H 1999. Forma digestiva da doença de Chagas, p.297-343. In Brener, Z., Andrade, Z. & Barral-Neto. M. (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ribeiro dos Santos R , Rossi MA , Laus JL ,Silva JS , Savino W & Mengel J 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 175: 29-39
- 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: 2864-2868.

- Russomando G, de Tomassone MMC, De Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF & 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.
- Sáez-Alquézar A, Luquetti AO, Borges-Pereira J, Moreira EF, Gadelha MFS, Garcia-Zapata MT & Arruda AHS 1997. Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, desníveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Pat Trop* 26: 343-374.
- Sá-Ferreira JS, Galvão-Castro B, Macedo V & Casto C 1983. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. *Clin Exp Immunol* 52: 266-270
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arheim N 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA 1988. Primer-directed, enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saldaña A & Sousa OE 1996. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*, *J Parasitol* 82: 363-366.
- Santos CND 1987. *Uso de seqüências de DNA na detecção e caracterização de Trypanosoma cruzi*, MSc Thesis, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Santos-Buch CA & Teixeira ARL 1974. The immunology of experimental Chagas' disease. III- Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J Exp Med* 140: 38-53.
- Scharfstein J, Rodrigues MM, Alves CA, Souza W, Previato JO & Mendonça-Previato L 1983. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J Immunol* 131: 972-976.

- Scharfstein J, Luquetti A, Murta ACM, Senna M, Rezende JM, Rassi A & Mendonça-Previato L 1985. Chagas' disease serodiagnosis with purified GP 25 antigen. *Am J Trop Med Hyg* 34: 1153-1160.
- Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L & Miles MA 1986. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57,000/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J Immunol* 137: 1336-1341.
- Schechter M & Nogueira N 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigens profiles. *Mol Biochem Parasitol* 29: 37-46.
- Schechter M, Luquetti AO, Rezende JM, Rassi A. & Miles MA 1985. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 637-640.
- Schechter M, Stevens AF, Luquetti AO, Snary D, Allen AK & Miles MA 1986. Prevalence of antibodies to 72-kilodalton glycoprotein (GP72) in patients with Chagas' disease and further evidence of zymodeme associated expression of GP72 carbohydrate epitopes. *Infect Immun* 53: 547-552.
- Schechter M, Voller A, Marinkelle CJ, Flint JE, Guhl F & Miles MA 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet*, 22: 939-941.
- Schmuñis GA 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. *Transfusion* 31: 547-557.
- Schmuñis GA 1999. A tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Américas, In Brener, Z., Andrade, Z. & Barral-Neto M (eds), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Schwartz DC, Cantor CR 1984. Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.

- Shikanai-Yasuda MA, Brisola Marcondes C, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP, Amato Neto V, Tolezano JE, Pers BA, Arruda Jr ER, Lopes MH, Shiroma M & Chapadeiro E 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 351-357.
- Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL & Ruiz AM 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol* 85: 225-232.
- Silveira JF, Paranhos GS, Cotrim PC, Mortara RA, Camargo ME, Rassi A, Wanderley J, Corral R, Freilij HL, Grinstein S & Degraive W 1990. Antigens of *Trypanosoma cruzi* with clinical interest cloned and expressed in *E. coli*. *Mem Ins. Oswaldo Cruz* 85: 507-511.
- Simpson L 1987. The mitochondrial genome of Kinetoplast protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41: 363-382.
- Snary D, Ferguson MAI, Scott MT & Allen AK 1981. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 3: 346-356.
- Sousa OE & Johnson JM 1973. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 22: 18-22.
- Souto RP and Zingales B 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 62: 45-52.
- Stum NR, & Simpson L 1990. Kinetoplast DNA minicircle encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61: 879-884.
- Stum NR, Degraive W, Morel C & Simpson L 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *T. cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 33: 205-214.
- Taibi A, Plumas-Marty B, Guevara-Espinoza A, Schöneck R, Pessoa H, Loyens M, Piras R, Aguirre T, Gras-Masse H, Bossus M, Tartar A, Capron A & Ouaisi A 1993. *Trypanosoma cruzi*: Immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens

- and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J Immunol* 151: 2676-2689.
- Tambourgi DV, Cavinato RA, De-Abreu CM, Peres BA, Kipnis TL 1995. Detection of Trypanosoma-decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 52: 516-520.
- Tang YW, Rys PN, Rutledge BJ, Mitchell PS, Smith TF, Persing DH 1998. Comparative evaluation of colorimetric microtiter plate systems for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 36: 2714-2717.
- Tarleton RL & Zhang L 1999. Chagas' disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94-99.
- Tarleton RL, Zhang L & Downs MO 1997. Autoimmune rejection of neonatal transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to injected host tissue. *Proc Natl Sci USA* 94: 3932-3937.
- Teixeira ARL & Pereira LM 1981. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregadas para diagnóstico da doença de Chagas. *Rev Brasil Biol* 41: 789- 795.
- Teixeira ARL & Santos-Buch CA 1975. The immunology of experimental Chagas' disease. IV- Production of lesion in rabbits similar to those of chronic experimental Chagas'disease in man. *Am J Pathol* 80: 163- 180.
- Teixeira MGM, Borges-Pereira J, & Peralta JM 1994. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Pat Clin* 30: 133-139.
- Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Castro JAF & Peralta JM. 1996. Analysis of protein profiles as a tool to differentiate *Trypanosoma cruzi* isolates obtained from different geographic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91 (Suppl): 257.

- Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Netizert E, Souza MLNX & Peralta JM 1994. Development and evaluation of an enzyme-linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol* 45: 308-312.
- Towbin H, Staehlin T & Gordon J 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tozetti IA 1997. *Avaliação de diferentes extratos antigênicos de Trypanosoma cruzi provenientes de cepas da América Latina por imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot. Influência da diversidade antigênica sobre resultados dos testes sorológicos*, MSc Thesis, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 61p.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Franco da Silveira J, Cotrim PC, Paranhos G & Katzin AM. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp Parasitol* 76: 352-357.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr., Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira ACV & Camargo ME. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 34: 2143-2147.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R & Franco da Silveira J 1999. Evaluation of recombinant antigens for the serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 37: 1554-1560.
- Vergara U, Lorca M, Veloso C, Gonzalez A, Engstrom A, Aslund L, Pettersson V & Frasch ACC 1991. Assay for detection of *T. cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 29: 2034-2037.
- 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: 39-43.

- Villalba R, Fornés G, Alvarez MA, Román J, Rubio V, Fernández M, García JM, Viñals M & Torres A 1992. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis* 14: 594-595.
- Voller A, Draper C, Bidwell DE & Bartlett A 1975. A micro-plate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas' disease. *Lancet*. 1: 426-429.
- Wagner W & So M 1990. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immun* 58: 3217-3224.
- Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W & Morel CM. 1994 a. 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.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM & Brenière SF. 1994 b. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Let* 124: 419-424.
- Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, Aznar C, Liegeard P, Hontebeyrie M, Noireau F, Morel CM & Breniere SF 1997. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* 114: 367-373.
- Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA 1995. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroreactivity. *Transfusion* 35: 219-225.
- World Health Organization 1991. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva - WHO Technical Report Series 811, 40p.
- World Health Organization 1993. Global Programme on AIDS - Safe Blood and Blood Products - Module: Screening for HIV and other infectious agents. WHO/GPA/CNP 93. 2C. Geneva. P. 106-110.

Zingales B, Abuin G, Romanha AJ, Chiari E & Colli W 1984. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. *Acta Trop* 41: 5-16.

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: 519-522.

Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F, Sablon E, Demarquilly C, Boniface M & Saman E 1998. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diag Lab Immunol* 5: 45-49.

ANEXO 2

Copia das instruções dos kits comerciais empregados neste trabalho.

BIOELISACRUZI®

Teste imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Código: 028.001	Embalagem para 192 testes
R1: 2 placas / 96 cavidades	R6: 1 x 2 ml
R2: 2 x 11 ml	R7: 1 x 5 pastilhas
R3: 1 x 80 ml	R8: 1 x 60 ml
R4: 1 x 2,0 ml	R9: 1 x 12 ml
R5: 1 x 3,0 ml	R10: 1 x 100 ml
	4 folhas adesivas

PRINCÍPIO:

Soros são incubados com componentes antigênicos solúveis de *Trypanosoma cruzi*, formas epimastigotas, previamente fixados as cavidades de placas plásticas. A reação antígeno-anticorpo é evidenciada por conjugado enzimático anti-IgG e solução cromógena. A intensidade da cor desenvolvida é avaliada por leitura espectrofotométrica.

REATIVOS:

Reativo 1	Placa plástica com 12 tiras de 8 cavidades recobertas com antígenos de <i>T. cruzi</i> .	Pronto para uso.
Reativo 2	Conjugado enzimático anti-IgG humana.	Pronto para uso, corado. <i>Validade: 18 meses a 2-8°C após abertura do frasco.</i>
Reativo 3	Solução diluente de amostras.	Pronto para uso, corado.
Reativo 4*	Soro controle negativo.	Pronto para uso, corado.
Reativo 5*	Soro controle de positividade limiar.	Pronto para uso, corado.
Reativo 6*	Soro controle positivo.	Pronto para uso, corado.
Reativo 7	Ortofenilendiamina (OPD)	Ver preparação dos Reativos.
Reativo 8	Solução diluente de OPD	Pronto para uso.
Reativo 9	Solução bloqueadora.	Pronto para uso. ATENÇÃO: CORROSIVA
Reativo 10	Solução de lavagem (20x conc.)	Ver preparação dos Reativos.

* Soros humanos não reagentes para anticorpos anti HIV e antígeno HBs.
Conservar a 2-8 °C até a data do vencimento indicada na etiqueta da caixa.

AMOSTRA:

Soro e plasma obtidos por punção venosa ou de coleta digital em capilares. A inativação do soro é facultativa.

RECOMENDAÇÕES DE HIGIENE E SEGURANÇA:

- As amostras desconhecidas devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manipuladas com as devidas precauções.
- Evitar qualquer contato do tampão substrato, do cromógeno e da solução bloqueadora com a pele e as mucosas (risco de toxicidade, irritação e queimaduras).

PREPARAÇÃO DOS REATIVOS:

- 1) Os reativos devem estar a temperatura ambiente (25 °C) no momento do uso. Se necessário, aquecê-los rapidamente em banho-maria a 37 °C.
- 2) Solução cromógena (R7 + R8) - (Preparar no momento do uso).
Dissolver uma pastilha de OPD (R7) em 10 ml de solução diluente de OPD (R8) em frasco âmbar. A solução deverá ser incolor ou ligeiramente amarelada. O desenvolvimento de coloração amarelo-alaranjada indica que o reativo não pode ser utilizado e deve ser substituído.

DOENÇA DE CHAGAS

PRECAUCÕES: Evitar umidade, poeira, ions metálicos ou contato manual, utilizando material limpo, lavado com água destilada.

Não utilizar nenhum objeto metálico na manipulação do OPD.

Para cálculo do volume de solução cromógena a ser preparada, observar o quadro abaixo:

CÁLCULO DO VOLUME DA SOLUÇÃO CROMÓGENA

Nº de Tiras (R1)	Pastilhas do OPD (R7)	Solução Diluente de OPD (R8)
1 - 10	1	10 ml
11 - 20	2	20 ml
21 - 24	3	30 ml

3) Solução de lavagem (R10)

Aquecer o frasco em banho-maria a 37 °C por 15 minutos, agitando ocasionalmente para completa dissolução de cristais eventualmente formados. Diluir 20x com água destilada. (Por exemplo: 50 ml de solução de lavagem 20x concentrada + 950 ml de água destilada).

A solução diluída pode ser armazenada em geladeira (4 °C) por 4 semanas.

PROCEDIMENTO:

Seguir rigorosamente o protocolo indicado.

- Incluir os soros controle negativo (R4), de positividade limiar (R5) e positivo (R6), a cada série de testes.

1 - Estabelecer o plano de distribuição e identificação das amostras e dos soros controle.

Verificar o número de tiras necessárias para a execução dos testes.

Incluir duas cavidades para o soro controle negativo (R4), duas para o soro controle positivo (R6) e três cavidades para o soro controle de positividade limiar (R5).

Quando necessário, reservar uma cavidade para a solução R3 que servirá para aferição do aparelho de leitura (Branco Reativo).

OBS: O soro de positividade limiar (R5) sempre deverá ser testado em triplicata para efeito de cálculo do "cut-off".

2 - Abrir o envelope e retirar do suporte as tiras que não serão utilizadas, guardando-as novamente no envelope metálico, fechando-o devidamente.

3 - Diluir a 1/21 as amostras a ensaiar com solução R3 (Homogeneizar antes do uso). As amostras podem ser diluídas em tubos ou diretamente nas cavidades da placa.

Em tubos: Pipetar 400 µl de R3 em tubos de ensaio, acrescentar 20 µl da amostra. Transferir 200 µl para as cavidades pré-estabelecidas.

Em placa: Pipetar 200 µl de R3 nas cavidades da placa pré-estabelecidas, acrescentar 10 µl da amostra.

IMPORTANTE: Ao pipetar as amostras proceder sempre limpeza externa da ponteira para retirar o excesso de soro (Utilizar papel absorvente).

Soros Controle: Pipetar 100 µl dos soros controle em cada cavidade previamente estabelecida (R4 e R6 em duplicata e R5 em triplicata).

4 - Para perfeita homogeneização, imprimir à placa vibração mecânica, batendo com os dedos nas bordas, seguidamente por 1 minuto. Recobrir com folha adesiva e incubar por 30 minutos a 37°C.

5 - Esvaziar as cavidades e lavá-las 3 vezes, enchendo e esvaziando seguidamente com a solução de lavagem (R10) diluída, como indicado em preparação dos reativos - item 3. Após a última lavagem, bater a placa invertida sobre papel de filtro para drenar todo o líquido.

6 - Distribuir 100 µl do conjugado (R2) em todas as cavidades. Recobrir a placa com outra folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

7 - Lavar como o item 5.

8 - Preparar o reativo cromogênio (R7 + R8) imediatamente antes do uso, como indicado em preparação dos reativos - item 2.

9 - Distribuir 100 µl do reativo cromogênio nas cavidades. Incubar a placa a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Não é necessário utilizar folha adesiva.

10- Bloquear a reação pela adição de 50 µl de R9 em todas as cavidades.

LEITURA:

Proceder à leitura da reação em espectrofotômetro para microplacas, utilizando filtro duplo 492/620, zerando o aparelho no ar. Caso este tipo de equipamento não esteja disponível, efetuar a leitura em filtro simples 492nm, zerando o aparelho com a cavidade do branco.

CÁLCULOS:

- 1 - Determinação da média de reatividade do soro controle de positividade limiar (cut-off):

Calcular a média dos valores de absorbância observados para o soro R5.

Exemplo: 0,220 - 0,180 - 0,200

$$\frac{0,220 + 0,180 + 0,200}{3} = 0,200$$

Caso ocorra uma leitura discrepante, diferindo de 30% ou mais do valor médio calculado, desprezê-la e fazer a média com as outras.

O valor encontrado corresponderá ao limiar de reatividade ou cut-off.

- 2 - Determinação da relação $\frac{A}{C}$ (Absorbância da Amostra) / Valor do cut-off

Para cada amostra testada, calcular a relação $\frac{A}{C}$ conforme exemplo abaixo:

- Absorbância da Amostra = 0,750

- Valor do cut-off = 0,200

- Relação $\frac{A}{C} = \frac{0,750}{0,200} = 3,7$

- 3 - Determinação da média de reatividade dos soros controles positivo e negativo para efeito de validação do teste:

Calcular a média dos valores da absorbância para R4 e para R6.

- O valor médio de R4 (controle negativo) não deverá ser maior do que 0,15 (R4 < 0,15)

- O valor médio de R6 (controle positivo) não deverá ser menor do que 0,6 (R6 > 0,6)

- R4 < limiar < R6

Resultados fora dessas especificações invalidam o teste.

ATENÇÃO:

QUALQUER CONTAMINAÇÃO DOS SOROS CONTROLE, ESPECIALMENTE DO SORO DE POSITIVIDADE LIMIAR (R5), PODE INVALIDAR OS RESULTADOS.

ESTES CONTROLES DEVEM SER MANIPULADOS COM PIPETAS ABSOLUTAMENTE LIMPAS.

INTERPRETAÇÃO:

- Absorbância igual ou maior do que o valor limiar (cut-off) ou relação $\frac{A}{C} \geq 1,0$: soro reagente.

- Absorbância 20% abaixo do valor limiar (cut-off) ou relação $\frac{A}{C} \leq 0,8$: soro não reagente.

- Absorbância até 20% abaixo do valor limiar (cut-off) ou relação $\frac{A}{C}$ entre 0,8 e 1,0: Reação duvidosa. Neste caso, recomenda-se a repetição do teste.

BIBLIOGRAFIA:

- 1 - FERREIRA, A.W., CAMARGO, M.E., and NAKAHARA, O.S. 1975 - *Trypanosoma cruzi*: immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. *Exp. Parasitol.* 37: 131-137.
- 2 - VOLLER A., DRAPER, O.C., BIDWELL, D.E., and BARLETT A., 1975 - Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet* 1: 426-429.
- 3 - CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; PERES, B.A., MENDONÇA-PREVIATO, L., and SCHARFSTEIN, J., 1986. *Trypanosoma cruzi* antibodies, p. 368-382. In H.U. Bergmeyer (ed), *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., vol. 11. Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- 4 - CAMARGO, M.E.; SEGURA, E.L.; KAGAN, I.G.; SOUZA, J.M.P.; CAVALHEIRO, J.R. and GUMARÃES, M.C.S. 1986. Three years of collaboration on the standardization of Chagas disease serodiagnosis on the American Continent. An appraisal. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 20: 233-244.
- 5 - CAMARGO, M.E. 1986 - American Trypanosomiasis (Chagas disease), p. 744-753. In BALLOWS A., HAUSLER W.J. and LENNETTE B.H. (ed), *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and practice*, Vol. 1, Springer-Verlag, New York Inc., New York.
- 6 - FERREIRA, A.W., BELEM, Z.R., MOURA, M.E.G. & CAMARGO, M.E. - Aspectos de padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 33(2): 123-128, março-abril, 1991.

Produzido por:

Biolab Diagnóstica S.A

Endereço

: Estrada do Mapuá, 491 - Jacarepaguá - RJ

Data de fabricação, Prazo de validade e N° do lote

: Vide Caixa

N° do Registro do M.S

: Vide Caixa

Responsável Técnico

: Ana Maria Lissaldo

CRF. RJ

: 5746

BIOQUÍMICA Enzimas BIOTICA

ENZIMAS - IgG

Ensaio imunoenzimático para a investigação de anticorpos tipo IgG anti-Trypanosoma cruzi em soro humano. 96 determinações. Teste diagnóstico 'in vitro'.

INTRODUÇÃO

Imunoenzima-En (IgG) é um ensaio imunoenzimático heterógeno, tipo competitivo, baseado no método indireto para a detecção de anticorpos anti-T.cruzi em amostras de soro humano.

Uma diluição apropriada dos soros é incubada em poquinhos de micropilares de poliestireno, recobertos com antígenos purificados de T.cruzi. Os anticorpos anti-T.cruzi são especificamente capturados por esses antígenos ficando unidos a fase sólida. Após várias lavagens, a fim de eliminar as imunoglobulinas não capturadas, o sistema é incubado com anticorpos secundários anti-IgG humana conjugados com peroxidase. Este conjugado reage especificamente com os anticorpos anti-T.cruzi imuncapturados. O conjugado não unido se descarta pela lavagem e se revela a presença de peroxidase mediante o adição de peróxido de hidrogênio tetrametilbenzidina como substrato cromogênico. Esta reação tem como resultado a aparição de coloração azul cuja intensidade depende da concentração e da afinidade dos anticorpos anti-T.cruzi da amostra. A reação enzimática pode ser bloqueada mediante o adição de ácido, o que produz viragem de cor para o amarelo.

REATIVOS E MATERIAIS PROVISTOS

-Poquinhos de reação: Um suporte contendo 12 tiras de poliestireno, com 8 poquinhos cada uma, sensibilizadas com antígenos purificados de T.cruzi, envasadas em um envelope metalizado com alicagem, com dessecante.

-Controle positivo (+): um frasco contendo 0,2ml de soro humano reativo para anticorpos tipo IgG anti-T.cruzi, inativado, de baixo título, com estabilizadores proteicos. Material potencialmente infeccioso. (Pronto para uso)

-Controle negativo (-): um frasco contendo 0,2ml de soro humano não reativo, inativado, com estabilizadores proteicos. Material potencialmente infeccioso. (Pronto para uso)

-Solução de lavagem 25x (1A): um frasco contendo 25ml de solução tamponada, com conservantes, concentrada 25 vezes para a lavagem dos poquinhos.

-Frasco lavador (1B): um frasco goteador vazio para preparar a solução de lavagem.

-Conjugado (3): um frasco goteador contendo 1mL de solução concentrada (10x) (dez vezes) de anticorpo monoclonal anti-IgG humana marcado com peroxidase, com estabilizadores proteicos (Pronto para uso).

-Substrato A (3A): um frasco goteador contendo 5mL de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tamponado (Pronto para uso).

-Substrato B (3B): um frasco goteador contendo 5mL de solução de 3,3',5,5'-tetraetilbenzidina (TMB) (Pronto para uso).

-Líquido das amostras e do conjugado (4): um frasco goteador contendo 50mL de solução salina proteica com conservante. (Pronto para uso).

ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Os reativos são estáveis até a data que figura na caixa e rótulos dos frascos.

Guardar os componentes do kit entre 2 e 8 °C sempre em posição vertical, em seus respectivos envases originais, perfeitamente tampados.

REATIVOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO PROVISTOS NO KIT

- Micropipetas de 10,100 e 200µL.
- Água destilada ou deionizada.
- Ácido sulfúrico 4M.
- Material volumétrico de vidro.
- Banho Maria a 37 °C.
- Fita adesiva.
- Cronômetro.
- Folha adesiva.
- Materiais de biosegurança (luvas, recipiente para resíduos perigosos, solução de hipoclorito de sódio a 5%).

PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os soros são obtidos de maneira habitual.
O sangue é extraído segundo as normas gerais e coletado em tubos de centrifuga. Para obter o soro deixar coagular o sangue, centrifugar e separar o sobrenadante. Os soros podem ser conservados entre 2 e 8 °C até 48 horas ou congelados a -20 °C para um armazenamento prolongado. Devem ser evitados os congelamentos descongelamentos repetidos.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES.

As amostras de soro humano e os controles positivo e negativo devem ser consideradas como potenciais portadores de agentes infecciosos, portanto se recomenda extremar as precauções na manipulação das mesmas.

- Não fumar, comer ou beber no lugar de trabalho.
- Evitar picadas com agulhas.
- Descontaminar os materiais utilizados.

- Não utilizar os componentes do kit depois da data de vencimento.
- Não misturar reativos de lotes diferentes.
- Não trocar as tampas dos frascos dos gotejadores.
- Deixar que os reativos atinjam a temperatura ambiente antes do uso. Uma vez utilizados, tampá-los imediatamente para evitar sua contaminação e armazená-los entre 2 e 8 °C.
- Não raspar o interior dos pocinhos.

PREPARAÇÃO DOS REATIVOS

- Pocinhos de reação: Estão prontos para usar. Separar a quantidade de tiras necessárias para o teste em curso. Se usar menos de 8 pocinhos, separá-los quebrando a tira e colocá-los no suporte. Os pocinhos restantes devem ser armazenados no envelope retificado fechado hermeticamente, conservando o dessecante em seu interior.
- Dilúente das amostras e do conjugado (4): Agitar antes de usar.
- Solução de lavagem: Diluir uma parte do conteúdo do frasco Solução de lavagem 25x (1A) em 24 partes de água destilada. Se se utiliza o Frasco lavador (1B) adicionar ao mesmo 1,4ml de Solução de lavagem 25x (1A) e completar com água destilada até a marca que indica 50ml. Homogeneizar bem. A solução assim preparada é estável entre 2 e 8°C até a data de vencimento.
- Conjugado (2): Momentos antes de usar, diluir uma parte do Conjugado em nove partes do Dilúente das amostras e do conjugado (4). Homogeneizar suavemente. Preparar a quantidade necessária para o teste em curso. A solução assim preparada é estável durante 4 horas a temperatura ambiente.

PROCEDIMENTO

1. Colocar os pocinhos da reação no suporte provido.
2. Adicionar a cada pocinho 200ul (5 gotas) de Dilúente das amostras e do conjugado (ver preparação dos reativos).
3. Dispensar com uma micropipeta exatamente 10ul da amostra a analisar no pocinho que contém o Dilúente das amostras previamente adicionado. Homogeneizar bem por carga e descarga da micropipeta. Repetir o mesmo com cada soro. Dispensar controle negativo e positivo em duplicata.
4. Agitar suavemente a micropipeta com movimentos circulares ou pequenos golpes na lateral, durante 10 segundos.
5. Colocar os pocinhos da reação com fita adesiva e incubar em banho maria a 37°C durante 20 minutos.
6. Evacuar totalmente os pocinhos por inversão ou aspiração e lavá-los 4 vezes. Para isto, enchê-los com solução de lavagem (ver preparação dos reativos) e evacuar-los, cada vez, por inversão ou aspiração, com um repouso de 30 segundos. Descartar

de elevatos em um recipiente para resíduos perigosos com uma solução de hipoclorito de sódio a 5%. For utilizado, inverter os pocinhos e bate-los sobre papel absorvente para eliminar o líquido residual. Alternativamente empregar lavador automático utilizando 300uL/vez/pocinho de solução de lavagem.

2.24 seguida adicionar 100uL de conjugado diluído (ver preparação dos reativos) a cada um dos pocinhos. Homogeneizar como se indicou no ponto 4 e incubar 20 min. em banho maria a 37°C.

3. Descartar por inversão a solução do conjugado e lavar 6 vezes como se indicou no ponto 6.

4. Adicionar a cada pocinho uma gota (50uL) de Substrato A (SA) e a seguir uma gota (50uL) de Substrato B (SB). Homogeneizar como se indicou no ponto 4 e incubar 10 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

5. Ler os resultados de forma visual imediatamente. Alternativamente parar a reação enzimática com 50uL de H2SO4 4N. Homogeneizar como se indicou no ponto 4 e medir a densidade óptica a 450 nm com um leitor de ELISA, empregando branco de ar (se pocinhos).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS NA FORMA VISUAL

O controle negativo deve ser incolor ou pode apresentar uma coloração celeste muito clara. O controle positivo por ser de baixo título deve ser de cor azul diferenciável do controle negativo. As amostras que derem reação incolor ou de coloração muito leve similar a do controle negativo, se considerarão não reativas. As amostras que evidenciam uma coloração azul ou celeste claramente distinguível do controle negativo se considerarão reativas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS COM LEITOR DE ELISA

Logo após a adição do ácido sulfúrico 4N, homogeneizar e medir a densidade óptica (DO) de cada pocinho a 450nm dentro dos 15 minutos após adição do ácido. A presença ou ausência de anticorpos tipo IgG anti-T.cruzi deve ser analisado tomando por base o limite de decisão (cut-off value).

É recomendável utilizar dois ou mais pocinhos para o controle não reativo.

Limite de decisão ou cut off =

DO média do controle não reativo + 0,100.

Uma prova é considerada não reativa se seu valor de DO é menor que o valor limite de decisão.

Uma prova é considerada reativa se seu valor de DO é igual ou maior que o limite de decisão.

CRITERIOS DE ACEITABILIDADE DA PROVA

A prova é considerada válida se:

A média da OD do controle negativo $\leq 0,200$

A média da OD do controle positivo \geq ou = o valor do cut-off

Caso contrário repetir o teste.

CONCLUSÕES

Toda amostra que tenha sido reativa na primeira prova deverá ser ensaiada novamente para sua confirmação. Se o resultado é negativo no segundo ensaio, a amostra é considerada não reativa. Resultados não reprodutíveis em sua reatividade deve-se a algumas das seguintes causas:

- Usagem incorreta dos bocininhos.
- Contaminação de uma amostra não reativa com uma amostra reativa adjacente.
- Contaminação dos substratos A e B com agentes oxidantes (como por exemplo cloro).
- Falta de oxigenação e homogeneização das amostras.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

O BIOLINA CHAGAS BIOTICA apresenta 100% de sensibilidade, assumindo uma prevalência de 100% na presença de anticorpos IgB específicos detectáveis por outras técnicas como IFI e uma especificidade superior a 99%.

BIBLIOGRAFIA

1. Piranesi, S.; Bruet, F.; Masselet, S. and Felzani, B.: Immunoenzymatic techniques. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1-140 (1983).
2. Cantarero, L.; Butler, J. and Osborne J.: The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significances in solid-phase immune assays. Analytical Biochemistry, 105:375-382 (1980)
3. Engvall, E.; Ferlinz, P.: Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology, Vol. 107, No. 1 July (1972).

Fabricante:	Importador/Distribuidor
Fabricado em:	Imuno Serua Biot Inc Com Ltda
Director Técnico: Jorge D. Carradori	FarmAss. Luzia Contar/CRF-SF 776
Santiago del Estero 1152	Rua Lacedemonia, 85
1075 Buenos Aires - Argentina	04634-010 São Paulo-SF
TEL: 364.2204/2274	TEL: (011) 543 8074/5551 7126
FAX: 365.0929	Fax: (011) 530 4579
Produto de diagnóstico "in vitro"	INSC. EST. 110.202.293.116
	CBC 51.177.822/0001-93
	SNVS/MS 01754
autorizado pelo M.S. e A.S.	PRODUTO REG. NO SNVS/MS SOB
certificado No. 142/93	No. 1017540005

ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA

1505
Abbott Laboratórios do Brasil Ltda
Divisão Diagnósticos
Rua Nova York, 245 - São Paulo - SP
05.4463-81

Enzaimunoenso para a detecção qualitativa do anticorpo contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas, em soro ou plasma humanos (EDTA, Oxalato de Potássio, Heparina e Anticoagulantes baseados em Citrato). O teste é destinado para uso como um auxiliar na diagnose antecipada da Doença de Chagas.

CENTRO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE
0800-11-9099
Lei No. 7A07-26

January, 1995

ATENÇÃO: PARA A IMPLEMENTAÇÃO DESTE ENSAIO SERÃO NECESSÁRIAS A ATUALIZAÇÃO DO SOFTWARE DE MEMÓRIA E/OU EDIÇÃO DE UM NOVO PROTOCOLO. POR GENTILEZA ENTRE EM CONTATO COM NOSSO CENTRO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE (CAC).

NOME E FINALIDADE DE USO

ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA é um ensaio imunoenzimático *in vitro* para a detecção qualitativa do anticorpo contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas em soro ou plasma humanos (EDTA, oxalato de potássio, heparina e anticoagulantes baseados em citrato). O teste é destinado para uso como um auxiliar na diagnose antecipada da Doença de Chagas.

RESUMO E EXPLANAÇÃO DO TESTE

Doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana, é uma condição causada pelo parasita *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. (*T. cruzi*).^{1,2} O vetor, um inseto, é responsável pela transmissão do parasita para os seres humanos e animais. Estes insetos depositam lezes contendo organismos infectantes na pele, enquanto se alimentam do hospedeiro. Os parasitas contidos nas lezes normalmente penetram no corpo através do ato de coçar, ou através das membranas mucosas. Durante vários sintomas, podemos incluir anemia, febre baixa, hepatoesplenomegalia, fraqueza, perturbações nervosas, calafrios, dores musculares e ósseas, vários graus de problemas cardíacos, e em menor grau, meningocelulite. A morte pode ocorrer entre três a quatro semanas após a infecção. Tipicamente, os sintomas são primeiramente relacionados às disfunções do sistema nervoso central periférico, que pode se prolongar por vários anos.^{3,4} Em algumas regiões da América Latina é comum a destruição do gânglio autonômico do estômago ou colon. Esta condição avançada e referida como megaesôfago ou megacolon respectivamente.⁵ Normalmente, o diagnóstico pode ser feito pela identificação do parasita no sangue, liquor, fixação em leucos ou nódulos linfáticos durante os períodos de febre alta. Pode ser difícil encontrar os organismos em outras ocasiões, ou em infecções crônicas. O método de identificação por xenodiagnóstico ou hemocultura, o procedimento pelo qual vetores se alimentam do sangue do paciente que, após incubações, são examinados para a presença de *T. cruzi*, ou pela hemocultura de amostras de sangue, que normalmente leva de 20 a 80 dias apresentando baixo índice de sensibilidade.⁶ Devido a estes problemas com a detecção do parasita, os testes sorológicos são alternativas aceitáveis. Respostas IgG específicas são detectadas logo após a infecção e, tipicamente, os títulos de tais anticorpos permanecem altos por toda a vida. As metodologias comumente empregadas são: hemaglutinação,⁷ imunofluorescência indireta,⁸ fixação do complemento,⁹ e enzima-immunoensaios.¹⁰ Uma das maiores preocupações com testes disponíveis é a especificidade.⁷

PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS DOS PROCEDIMENTOS

O ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA é um ensaio imunoenzimático para a detecção qualitativa do anticorpo contra o *T. cruzi*. Pérolas recobertas com antígeno de *T. cruzi* são incubadas com as amostras (Controlas ou espécimes). Os anticorpos contra o *T. cruzi* presentes na amostra ligam-se ao antígeno de *T. cruzi* contidos nas pérolas. Os materiais não ligados são removidos pela lavagem das pérolas.

O conjugado de imunoglobulina com peroxidase de rábano silvestre anti-humano (HRPO) é incubado com as pérolas e, na presença de anticorpos contra o *T. cruzi* na amostra, o conjugado liga-se aos anticorpos contra o *T. cruzi* contidos na pérola. O conjugado não ligado é removido pela lavagem das pérolas. As pérolas são então incubadas com uma solução de Substrato de o-Fenilendiamina (OPD), contendo peróxido de hidrogênio. A reação da Solução de Substrato de OPD com HRPO desenvolve uma cor amarelo-laranja. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de anticorpos contra o *T. cruzi* presentes na amostra. A reação enzimática é cessada pela adição de Ácido Sulfúrico 1N, e a intensidade da cor desenvolvida, é determinada usando-se um espectrofotômetro ajustado a 492 nm.

REAGENTES

Kit Diagnóstico ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, 100 Testes.

- 100 Pérolas revestidas com antígeno derivado de *T. cruzi* (inativado).
- 3 frascos (1 mL cada) de Conjugado Concentrado, IgG Anti-Humano (Cabral) (HGL); Peroxidase (Rábano Silvestre), Concentração mínima: 2,5 µg/mL em soro animal (bezerro) e tintura vermelha nº 33. Conservante: Agentes Antimicrobianos.
- 3 frascos (19 mL cada) de Diluente Conjugado contendo soro animal (cabra e bezerro) em tampão TRIS. Conservante: Agentes antimicrobianos.
- 1 frasco (0,5 mL) de Controle Positivo Plasma humano inativado, recalificado, reativo para anti-*T. cruzi* e não-reativo para HBSAg, Anti HIV e anti-HCV. Conservante: Azida sódica 0,1%.
- 1 frasco (0,5 mL) de controle negativo. Plasma humano recalificado, não-reativo para anti-*T. cruzi*, HBSAg, Anti-HIV e Anti-HCV. Conservante: Azida sódica 0,1%.
- 2 frascos (30 mL cada) de diluente de amostra contendo soro animal (cabra, bezerro) em Proteína de Tampão TRIS estabilizado, 0,3% Tris@ X-100. Conservante: Azida sódica 0,1%.
- 1 frasco (10 pastilhas) de Pastilhas de OPD (o-Fenilendiamina.2HCl). OPD/Pastilhas: 12,8 mg

- ④ 1 frasco (55 mL) de diluente para OPD (o Fenilendiamina + 2 HCL). Tampão Citrato-Fosfato contendo 0,02% de Peróxido de hidrogênio.

O reagente parafinado pode ser fornecido como um acessório ao kit de ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA e consiste de:

- ④ Ácido sulfúrico 1N, No. 7212. (A maioria dos Estados Unidos e Localidades Internacionais).
 O uso de ácido sulfúrico que não o fornecido pela ABBOTT poderá causar instabilidade no desenvolvimento da cor. Para que seja adequado como reagente de paralização, o ácido sulfúrico, sempre que for preparado, deve passar pelo teste a seguir. O teste seguinte não pode ser executado sobre o Sistema COMMANDER®. Usar um espectrofotômetro Quantim™ II, Ouarumatic™, ou espectrofotômetro apropriado para realizar este teste.

1. Pipetar 300 µL de Solução de Substrato em 5 tubos de reação EIA, ou tubo lavado com ácido e enzagado com água deionizada ou destilada.
2. Adicionar 1 mL do Ácido sulfúrico 1N a ser testado em cada um dos 5 tubos.
3. Medir a Abs de Solução de OPD/Ácido contra a água destilada ou deionizada em "TEMPO 0" e "120 MIN".
4. Calcular a absorbância média em "TEMPO 0" e "120 MIN".
5. Para ser aceitável, o ácido deve apresentar:
 - a. Uma Abs menor que 0,040 em "TEMPO 0" e
 - b. Uma diferença de menos que 0,03 unidades nos valores obtidos em "TEMPO 0" e "120 MIN".

™ - Marca Comercial

® - Marca Comercial Registrada

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para Uso Diagnóstico "IN VITRO"

Precauções de Segurança

CUIDADO: Os componentes de origem humana foram analisados pelos testes atualmente exigidos pelo FDA e demonstraram ser não infecciosos. Entretanto, como não existe metodologia de teste que possa oferecer completa segurança de que as amostras de laboratório não contêm HIV, vírus da Hepatite B ou outros agentes infecciosos, essas amostras e amostras de pacientes devem ser manuseadas de acordo com as práticas de Biosegurança Nível 2, conforme recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro humano potencialmente infeccioso, conforme descrito na publicação CDC NIH, *Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos*, 1988, páginas 12-16¹¹, ou outras práticas equivalentes.^{12,13} O Controle Positivo foi inativado por tratamento a quente.

1. Não pipetar com a boca.
2. Não fumar, comer ou beber em áreas onde as amostras ou reagentes do kit estiverem sendo manuseados.
3. Usar luvas descartáveis enquanto estiver manuseando os reagentes ou amostras.
4. Evitar contato do OPD e do ácido sulfúrico com a pele e membrana mucosa. Se esses reagentes entrarem em contato com a pele, lavar a região com água corrente.
5. Lavar e desinfetar todos os respingos de amostras e reagentes, usando um desinfetante apropriado 1:10, como hipoclorito de sódio 10% para material não reativo¹⁴ ou glutaraldeído 2% para respingos contendo material radioativo¹⁵.
6. Descartar todos os materiais que tiverem entrado em contato com as amostras e reagentes, de acordo com regulamentos locais, estaduais e federais.¹⁷ Resíduos sólidos podem ser incinerados ou colocados em autoclave por um período de tempo apropriado. Devido às variações entre autoclaves e na configuração de resíduos, cada usuário deve verificar a eficácia de seu ciclo de descontaminação usando indicadores biológicos.¹⁸

NOTA: Sobras líquidas contendo ácido devem ser neutralizadas antes da adição do desinfetante ou descartar.

7. Este produto contém ácido sulfúrico como preservativo, a qual é conhecida por formar ácido de chumbo ou cobre no sistema de sondagem de laboratório. Essas substâncias podem espelir sob pressão, tais como manuseio. Para prevenir tal formação, lave bem os dedos com água em abundância após o uso das soluções contendo ácido sulfúrico.

Para remover a contaminação dos dedos velhos com suspeita de acúmulo de ácido, o National Institute for Occupational Safety and Health recomenda o seguinte:

- (1) Retirar com sêco o líquido preso usando uma mangueira de borracha ou de plástico
- (2) Encher com solução de hidróxido de sódio a 10%.
- (3) Deixar descansar por 16 horas.
- (4) Lavar bem com água em abundância.

Precauções no Manuseio

- 1 Não usar kit após vencimento.

2. Não misturar reagentes de diferentes lotes.

NOTA: Qualquer lote de Diluente para OPD, de pastilhas OPD ou de ácido, pode ser usado com qualquer kit ABBOTT EIA.

3. Evitar contaminação microbiana das amostras, dos reagentes e da água utilizada para lavagem. O uso de peneira descartável para pipeta é recomendável. Evitar contaminação química dos reagentes e do equipamento.
4. Não expor os reagentes OPD à luz intensa durante o armazenamento ou incubação.
5. Evitar contato da solução de Substrato de OPD e do Ácido Sulfúrico 1N com qualquer agente oxidante ou partes metálicas. Antes do uso, enxaguar bem com Ácido 1 N (Sulfúrico ou Clorídrico) os materiais de vidro que entrarão em contato com a solução de Substrato de OPD, usando aproximadamente 10% do volume do recipiente, seguido por três lavagens de água destilada no mesmo volume.
6. Se o produto desumidificador obstruir a passagem das pérolas, removê-lo do frasco de pérolas antes de dispensá-las. Recolocar o produto desumidificador e tampar bem o frasco para armazenamento. Não guardar as pérolas com o dispensador conectado ao frasco.
7. Usar um dispensador apropriado para a solução de conjugado, a fim de evitar neutralização.
8. Os Controles Negativo e Positivo, devem ser dispensados da mesma forma que as amostras.
9. Certificar-se de que as amostras foram adicionadas aos poços de reação. Caso contrário, o ensaio apresentará um falso resultado não reativo.
10. A não obediência às "Instruções de Uso" pode resultar em valores errôneos.
11. Usar equipamento calibrado de medição precisa.

INSTRUÇÕES PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO DE SUBSTRATO DE OPD

Deixar que os Reagentes OPD atinjam temperatura ambiente (15 a 30°C).

CUIDADO: Não abrir o frasco de pastilhas de OPD antes do mesmo atingir temperatura ambiente.

Cinco a dez minutos antes do Desenvolvimento da Cor, preparar a Solução de Substrato de OPD dissolvendo as pastilhas de OPD (o-Fenilendiamina + 2HCL) em Diluente para OPD. NÃO USAR UMA PASTILHA QUE NÃO ESTIVER INTACTA.

Usando pipetas limpas e não metálicas (por exemplo, artigos de plástico ou de vidro lavados em ácido/água destilada) seguir o procedimento abaixo:

1. Transferir para um recipiente apropriado 5 mL do diluente para OPD para cada pastilha a ser dissolvida.
2. Transferir o número apropriado de pastilhas OPD (ver Tabela de Preparação de OPD) para uma quantidade medida de Diluente para OPD, usando uma pinça não metálica ou equivalente. Retornar o produto desumidificador imediatamente ao frasco e fechar bem.
 Deixar que a(s) pastilha(s) se dissolva(m). Não limpar o frasco de Solução de Substrato enquanto as pastilhas de OPD estão se dissolvendo.

NOTA: A solução de Substrato de OPD DEVE ser usada dentro de 60 minutos após preparação e NÃO DEVE ser exposta à luz intensa. Registrar a hora de preparação e a data de validade da Solução de Substrato de OPD sobre o frasco.

3. Antes de dispensar para o Desenvolvimento da Cor, agitar levemente o frasco para obter uma solução homogênea. Remover as bolhas de ar da tubulação de dispensa e preparar o dispensador antes de usar.

TABELA DE PREPARAÇÃO DE OPD

No. de Testes	Pastilhas	Diluentes
13	1	5 mL
28	2	10 mL
43	3	15 mL
58	4	20 mL
73	5	25 mL
88	6	30 mL
103	7	35 mL
118	8	40 mL
133	9	45 mL
148	10	50 mL

NOTA: São necessários 300 µL de Substrato de OPD para cada amostra e controle, bem como para cada branco de substrato. Para laboratórios usuários do COMMANDER® Parallel Processing Center (PPC) será necessário Solução de Substrato de OPD adicional para a preparação do instrumento

INSTRUÇÕES PARA ARMAZENAMENTO:

- 1 Armazenar todos os reagentes do kit à temperatura de 2 a 8°C. As pastilhas OPD e o Ácido Sulfúrico 1N devem ser armazenados a 2-30°C. Os reagentes do kit foram testados após um ciclo de congelamento/descongelamento e não foi observada diferença alguma.
- 2 Todos os reagentes devem atingir temperatura ambiente (15 a 30 °C) para uso e recolocados às condições de armazenamento, conforme indicado acima, imediatamente após o uso.
- 3 **CUIDADO: Não abrir o vidro com pérolas ou pastilhas de OPD até que os mesmos atinjam a temperatura ambiente.**
- 4 Manter o produto desumidificador no frasco com as pastilhas de OPD, durante todo o armazenamento.
- 5 A solução de substrato de OPD reconstituída DEVE ser armazenada à temperatura ambiente, e deve ser utilizada dentro de 60 minutos. Não expor à luz intensa.
- 6 Recolocar o produto desumidificador no frasco de pérolas e fechar bem para armazenamento

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

A Solução de Substrato de OPD mais a Solução deve ser incolor ou amarelo bem claro. Uma coloração amarelo-alaranjada indica que o reagente foi contaminado e deve ser desprezado. A presença de precipitados nas soluções dos reagentes pode ser indicação de instabilidade ou deterioração, e portanto deve ser desprezado.

Um valor menor do que 0,550 unidades de absorvância para a diferença entre a média dos Controles Positivos e Negativos (P-N) também pode indicar erros de técnica, deterioração dos reagentes do kit ou do reagente OPD. Tais dosagens também devem ser repetidas.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE

O ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA pode ser testado em soro ou plasma humanos.

- 1 Pode-se utilizar soro (incluindo soro coletado em tubos separados) ou plasma obtidos a partir de amostras, coletadas com anticoagulantes baseados em EDTA, oxalato de potássio, heparina ou citrato. É necessário ter a proporção correta da quantidade de anticoagulante para o volume de amostra, conforme recomendado pelo fabricante do anticoagulante. O soro ou plasma deve ser removido do código o mais rápido possível, a fim de se evitar a hemólise. Sempre que possível, deve-se usar amostras claras e não hemolizadas. Amostras contendo qualquer tipo de precipitado podem fornecer resultados inconsistentes. Estas amostras devem passar por processos de clarificação antes de serem utilizadas.
- 2 Não usar amostras inativadas por calor
- 3 Não foram estabelecidos resultados utilizando-se amostras de cadáveres ou outros fluidos que não soro ou plasma, tais como urina, saliva ou fluido pleural
- 4 Se as amostras forem destinadas ao armazenamento, elas devem ser armazenadas como soro ou plasma. A temperatura de 2 a 8°C até 14 dias. Para períodos de armazenamento superiores a 14 dias, as amostras devem ser congeladas a -10°C ou mais frio. Dez amostras relativas não mostraram diferenças qualitativas no desempenho, quando submetidas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento. Todavia, múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento devem ser evitados, se possível. As amostras devem ser misturadas completamente após o descongelamento e antes dos procedimentos de teste.
- 5 As amostras a serem despachadas devem ser embaladas e rotuladas de acordo com os regulamentos federal e internacional, sobre transporte de amostras clínicas e agentes etiológicos (42 CFR 72). As amostras devem ser despachadas em ambiente refrigerado, em gelo úmido (2 a 8°C), ou congeladas em gelo seco (-10°C ou +1°C)
- 6 Amostras com contaminação microbiana comprovada não devem ser usadas
- 7 Quando o paciente estiver sendo monitorizado por ensaio de amostras seriadas deve continuar utilizando o mesmo tipo de amostras durante toda a monitorização
- 8 Todos os artigos de vidro ou de plástico que tiverem contato com as amostras devem estar livres de qualquer resíduo de outras amostras, reagentes ou componentes de limpeza

PROCEDIMENTO

Materiais Fornecidos

Kit Diagnóstico ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA No. 7A07, 100 Testes

(Ver REAGENTES para uma listagem completa)

É necessário uma combinação otimizada dos seguintes acessórios:

- Bandejas de Reação

- Selos de Cobertura
 - Tubos de Reação com etiquetas de identificação
 - Ácido sulfúrico 1N, No. 7212 (A maioria dos Estados Unidos e outras Localidades Internacionais)
- NOTA:** Uma lista de acessórios específicos para o COMMANDER® Flexibile Pipetting Center (FPC) e PPC pode ser encontrada no Manual de Operações do COMMANDER®.

Materiais Necessários, Porém não Fornecidos

- Pipetas de precisão com ponteiros descartáveis ou equipamento similar para dispensar 10 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL (tolerância +/- 5%) e 1 mL (tolerância +/- 10%).
- Equipamentos para dispensar água destilada ou deionizada como o Gorman Rupp® Dispensing Pump ou equivalente, num volume total de 20 a 30 mL de solução de ensaio.
- OviWash® ou sistema de aspiração e lavagem das peças como o Pentawash® ou equivalente, para dispensar 4 a 6 mL por poço, com fonte de vácuo como a Gas® Vacuum Pump, e um sítio duplo para reter o aspirado e manter o vácuo mínimo de 21 polegadas de mercúrio.
- O Lavador de Pérolas ProQuantum® e o Dispensador de Reagente podem também ser usados neste ensaio.
- Incubador Dinâmico COMMANDER® ou banho-maria com capacidade de manter a temperatura entre 38 e 42°C.
- Pipetas descartáveis, graduadas e dispensador para medição do diluente para OPD
- Recipientes não metálicos para a solução de substrato de OPD, que podem ser de plástico ou de vidro, lavado com ácido e enxaguado com água destilada.
- Luvas protebrabras.
- Desinfetante, como descrito na seção Precauções de Segurança.
- Peças não-metálicas
- COMMANDER® PPC, Quantum™ II ou Quantumatic™.
- Dispensador de pérolas.
- Tubos de ensaio para diluição de amostras.
- Aparelho de puntura para remoção do selo de proteção dos frascos de ábodo.
- Cobertura para as bandejas de OPD.
- Pérolas em branco (para teste COMMANDER®).
- Água destilada ou deionizada.

PROCEDIMENTOS DO TESTE ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA

Comentários preliminares

Os laboratórios usuários do COMMANDER® FPC, PPC e Incubador Dinâmico (DI) devem consultar o(s) Manual(is) do Operador de COMMANDER® e observar as instruções especiais COMMANDER® abaixo. Ao usar outra instrumentação automática para dispensar controles e amostras, assegurar-se desta ser compatível com este ensaio. Seguir as instruções do fabricante para alcançar os volumes apropriados e as diluições necessárias, e dentro dos limites recomendados. A precisão de tempo na incubação é crítica no teste imunoenzimático. Seguir a ordem exata de adição das amostras e reagentes, como recomendado nas etapas do PROCEDIMENTO DE ENSAIO.

Ensaiar três Controles Negativos, três Controles Positivos e as amostras, usando um frasco de contigado diluído na operação de ensaio. Uma operação de ensaio é definida como um mínimo de três Controles Negativos, três Controles Positivos e uma amostra sobre uma bandeja de 20 ou 60 poços, ou um máximo de três Controles Negativos, três Controles Positivos e 494 amostras sobre bandejas de 20 ou 60 poços, usando um frasco inteiro de contigado diluído (100 Testes). Usar uma preparação de reagentes reconstruídos por operação. Assegurar-se de que todas as bandejas de reação contendo Controles, soro ou amostras sejam submetidas ao mesmo processo o tempo de incubação, isto requer manutenção de intervalos de tempo específicos entre o processamento das bandejas. Uma vez iniciado o teste, todas as etapas e incubações subsequentes devem ser concluídas sem interrupção.

CUIDADO: Usar uma ponteira descartável para pipeta, separada para cada Controle e Amostra, a fim de evitar contaminação cruzada.

2. Antes de iniciar o teste, deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (15 a 30°C) e agitar levemente. Ajustar o Incubador Dinâmico COMMANDER®: banho-maria ou equivalente para 38 a 42°C.
3. Identificar os poços da bandeja de reação para cada Controle e amostra.
4. Certificar-se de ter disponível conjugado diluído suficiente. Se necessário, preparar reagente conjugado adicional (Ver a seção INSTRUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DO REAGENTE CONJUGADO a seguir). Não misturar os frascos de reagente conjugado diluído.
5. Para cada frasco de Conjugado Diluído devem ser processados Controles Negativo e Positivo separados.
6. Após cada etapa, verificar visualmente se existe solução suficiente para cobrir a pérola em cada poço.
7. Deve-se seguir a ordem exata de adição de amostra e reagente, conforme descrita no procedimento de teste.

INSTRUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DO REAGENTE CONJUGADO:

1. Deixar o conjugado concentrado e o diluente do conjugado atingir temperatura ambiente antes de misturar.
2. Esvaziar cuidadosamente o conteúdo do frasco de Conjugado Concentrado (cor vermelha) dentro do frasco de diluente de conjugado. Este procedimento pode ser realizado mais eficientemente comprimindo-se com cuidado o frasco pequeno de 2 a 3 vezes, e mantendo a ponta do frasco dentro da boca do frasco de diluente de conjugado. Evitar formar espuma. Um frasco de conjugado diluído é suficiente para 100 testes (ml de 100 testes).
3. Tornar a fechar o frasco de diluente de conjugado. Homogeneizar adequadamente invertendo o frasco por várias vezes. O conteúdo deve se apresentar vermelho. Não agitar no Vortex.
4. Anotar a data de diluição e do vencimento no espaço destinado no rótulo do frasco de Diluente de Conjugado. O Conjugado, assim preparado, é estável por 20 dias (não exceder a data de validade do kit) quando armazenado entre 2 e 8°C.
5. Deixar o conjugado diluído se equilibrar à temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos antes de usar.
6. Armazenar o conjugado diluído à temperatura de 2 a 8°C. Deixar atingir a temperatura ambiente antes de usar.

NOTAS DE PROCEDIMENTO

PIPETAGEM E DILUIÇÃO DA AMOSTRA

- A. Ao usar o ABBOTT COMMANDER® FPC para diluição da amostra: Usar o protocolo de ensaio FPC apropriado para a diluição de amostra do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. (Esses protocolos pipetam 5 µl de Controles ou amostras mais 200 µl de Diluente de Amostra. Isto resulta numa diluição final de 1:41).

NOTA: NÃO DISPENSAR DILUENTE DENTRO DAS BANDEJAS ANTES DE DISTRIBUIR NO FPC.

NOTA: Este ensaio não pode ser executado com o software FPC, versão 1.0.

- B. Ao usar um método manual para diluição da amostra, seguir as etapas na seção "Diluição da Amostra" do PROCEDIMENTO DE ENSAIO.

SELEÇÃO DO ENSAIO E BRANCO SOBRE O FPC

- A. Inserir a bandeja e selecionar o número de ensaio apropriado para o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. Pode ser usada uma versão editada pelo operador, se as linhas editadas forem consistentes com as especificações contidas nas "Instruções de Uso" do ensaio, bem como se estiverem de acordo com a documentação na hora da edição. Seguir as instruções no painel do instrumento.

- B. Verificar a indicação do dispensador de reagente:

Estação	Reagente	Volume do Dispensador
1, 2, 3, 4, ou 5	Diluente de Amostra	200 µL
2	Conjugado	200 µL
4	Solução de OPD	300 µL
5	Ácido	300 µL

NOTA: A Estação para dispensa de Diluente de Amostra é designável pelo Operador.

- C. Ajuste do branco (somente COMMANDER®)

NOTA: Usar apenas as pérolas reagentes do branco COMMANDER®.

1. Durante o estágio de incubação do conjugado, preparar uma bandeja de "brancos" usando uma bandeja separada. Colocar uma pérola em branco em cada um dos cinco poços, de A1 até A5.

2. Ao concluir o estágio de incubação do conjugado, pressionar a Tecla Blank e inserir a bandeja de "brancos", seguida imediatamente pela bandeja do 1º ensaio.
3. Ao finalizar o estágio de incubação de OPD, inserir a bandeja de "brancos" como a 1ª bandeja da bateria.

OBSERVAÇÕES GERAIS

1. Os controles Negativo e Positivo devem ser tratados como amostras.
2. Não deixar respirar amostra ou Conjugado fora dos poços ou transbordar dos mesmos, de maneira que não possa ser removido em lavagens subsequentes e causar interferência de teste.
3. Amostras contendo Diluente podem ser armazenadas em bandejas de ensaio por até 24 horas, à temperatura de 2 a 30°C, com o selo adesivo de cobertura bem colocado. Deixar as amostras diluídas atingir temperatura ambiente (15 a 30°C) antes de dispensar as pérolas.
4. Verificar se o equipamento dispensa volume especificado e diluições apropriadas a cada procedimento.
5. Ao dispensar as pérolas, remover a lâmpada do frasco, alinhar o Dispensador de Pérolas ao mesmo e colocar as pérolas nos poços da bandeja de reação.
6. Assegurar-se de aderir bem os selos de cobertura nos poços.
7. Não deixar respirar o líquido enquanto estiver balanceado levemente a bandeja.
8. Ao lavar as pérolas, seguir as orientações fornecidas com o equipamento de lavagem, para fornecer um volume total de 11 a 18 ml, para cada pérola. Usar água destilada ou deionizada.

INCUBADOR DINÂMICO COMMANDER®

Ao usar o Incubador Dinâmico COMMANDER®, selecionar o método de incubação STATIC, bem como a temperatura e o tempo de incubação designados no PROCEDIMENTO DO ENSAIO seguinte. Usar o método de incubação STATIC por todo o ensaio. A falta do uso do Incubador Dinâmico do modo descrito no Manual do Operador do Incubador Dinâmico pode causar resultados de ensaio incorretos.

Desenvolvimento da Cor

1. Ao transferir as pérolas dos poços para os tubos de teste, alinhar os suportes invertidos dos tubos, orientados sobre a bandeja de reação. Pressionar bem os tubos sobre os poços e inverter a posição da bandeja e os tubos, em conjunto, para que as pérolas caiam nos tubos correspondentes. Realizar o excesso de água da parte superior do suporte de tubos.
2. Evitar luz forte durante o estágio de Desenvolvimento da Cor.
3. Não deixar que a solução ácida ou Solução de Substrato de OPD entre em contato com metais.
4. Não deixar que a solução ácida ou Solução de Substrato de OPD entre em contato com metais.

NOTA: Os dispensadores de Diluente, Conjugado e Substrato de OPD devem ser enrugados com água destilada, deionizada ou purificada após cada uso. Consultar todas as "Instruções de Uso" dos dispensadores para o procedimento de limpeza.

Leitura (QUANTUM™ II ou QUANTUMATIC™)

1. Remover as bolhas de ar antes da leitura da absorbância.
2. Inspeccionar visualmente os tubos de brancos e desprezar aqueles que estiverem contaminados (indicados pela cor amarelada/alaranjada). Se os tubos de brancos estiverem contaminados, toda a operação deve ser repetida.
3. Determinar a absorbância do branco de substrato. No Modo 0, zerar o instrumento com o tubo de água e considerar o branco de substrato como uma amostra. (Modo 0 refere-se ao modo 0 no QUANTUM™ II e Ensaio 0 no QUANTUMATIC™). Para o ensaio Modo 0, o valor de absorbância do branco de substrato relativo àquele do tubo de água deve ser maior ou igual a -0,020, e menor ou igual a 0,040, para que o ensaio seja válido.
4. Uma vez válido o branco de substrato, utilizá-lo para zerar o instrumento. Considerar então como amostras os Controles Negativo e Positivo. Se o branco de substrato não for válido, reparar os Estágios 3 e 4 usando o branco de substrato alternativo. Se ambos os brancos de substratos forem inválidos, a operação deve ser repetida.

PROCEDIMENTO DO TESTE (Ver Comentários Preliminares e Observações do Procedimento)

Laboratórios usuários do COMMANDER® FPC ou PPC devem seguir os procedimentos do(s) manual(is) do Operador COMMANDER. Ao usar outra instrumentação automatizada para dispensar controles e amostras, seguir as orientações do fabricante para alcançar os volumes apropriados e diluições necessárias. O Procedimento de Teste seguinte deve ser usado com o QUANTUM™ II e o QUANTUMATIC™.

CUIDADO: Verificar se o equipamento dispensa amostras especificadas e/ou volumes de reagente e não introduz contaminação-cruzada.

Diluição da amostra

1. a. Pipetar 10 µL de cada Controle ou amostra no fundo de um tubo de ensaio individual ou poço de uma bandeja de pré-diluição

- 1 b. Dispensar 400 µL de Diluente a cada tubo de ensaio, pouco de pré-diluição ou equivalente.
 - 1 c. Bater cuidadosamente as bandejas para assegurar mistura adequada.
 - 1 d. Transferir 200 µL de cada Controle ou amostra diluída dentro do poço apropriado da bandeja de reação.
- PRIMEIRA INCUBAÇÃO**
- 2 Cuidadosamente, adicionar uma gota de cada poço da bandeja contendo Controle ou amostra diluídos.
 - 3 Aplicar o selo adesivo de cobertura; bater levemente a bandeja para cobrir as pérolas e para remover possíveis bolhas de ar.
 - 4 Incubar à temperatura de 38 a 42°C por 55 a 65 minutos.
 5. Remover e desprezar o selo de cobertura. Lavar cada pérola.

SEGUNDA INCUBAÇÃO

6. Pipetar 200 µL de Conjugado diluído em cada poço de reação
7. Aplicar um novo selo de cobertura, bater levemente a bandeja
8. Incubar à temperatura de 38 a 42°C por 28 a 32 minutos.
9. Remover e desprezar o selo de cobertura. Lavar cada pérola.

DESENVOLVIMENTO DA COR

10. Transferir imediatamente as pérolas para os tubos de teste
11. Preparar o Dispensador de OPD imediatamente antes de Dispensar a solução de Substrato de OPD.
12. Pipetar 300 µL de Solução de Substrato de OPD recém-preparada em dois tubos vazios (branco de substrato) e depois em cada tubo contendo uma pérola.

13. Cobrir e incubar à temperatura ambiente (15 a 30°C) por 28 a 32 minutos.

14. Adicionar 1 mL de Ácido Sulfúrico 1N a cada tubo. Agitar para misturar.

PREPARAÇÃO DO TUBO DE ÁGUA

15. Pipetar aproximadamente 2 mL de água destilada ou deionizada dentro de um tubo de Teste vazio.

LEITURA

16. No "Mode 0", zerar o instrumento com o tubo de água. (Ver o Manual do Operador para execução do "Mode 0").
17. Determinar a absorbância do branco de substrato. Para ser válido, o branco de substrato deve ser maior ou igual a -0,020 e menor ou igual a 0,040. Parar o ensaio Mode 0.
18. Selecionar o Modo para processamento do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA.
19. Zerar o instrumento com o branco de substrato válido.
20. Determinar a absorbância dos Controles e amostras (dentro de 2 horas após a adição de ácido).

LEITURA DOS RESULTADOS

INSTRUMENTOS

O desempenho do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA requer o uso de um espectrofotômetro de precisão (por exemplo, COMMANDER® PPC, QUANTUM™ II ou QUANTUMATIC™). Consultar o Manual do Instrumento para Operação e Calibração apropriados.

NOTA: Ao usar um COMMANDER® PPC, QUANTUM™ II ou QUANTUMATIC™, consultar o Manual do Operador para determinar quais cálculos são executados automaticamente. Se um desses instrumentos não for usado, executar os cálculos nos Procedimentos de Controle de Qualidade e Resultados a partir dos dados do ensaio.

PPC:

Laboratórios usuários do COMMANDER® Parallel Processing Center devem usar a versão 6.00 do software ou superior. Laboratórios usuários das versões 6.00, 6.10, 6.01 ou 6.11 do software devem citar um protocolo de ensaio editado. Editar o protocolo de ensaio PPC #07 ou 23 para combater os parâmetros do protocolo de ensaio abaixo. Todos os outros valores não são definidos (N/A) para o ensaio. Verificar para que os parâmetros do protocolo editado combinem com os protocolos do ensaio impressos abaixo

PROTÓCOLO PPC

Assay Number	(como assinalado pelo operador)
Assay Name	ABBOTT CHAGAS EIA
Reminder	.
SMC Test Number	(como assinalado pelo instrumento)
Lumi Table	OPD
Blanking	CUTOFF
Data Reduction	

Well Status Flag	Y	
Multiple Trays	Y	
Technician Identification	Y	
Master Lot	Y	
Sample IDs	Y	
Number of Blanks	05	
Unknown Replicates	01	
Wash 1	01	
Dispense Volume 1	200	CHAGAS CONJ
Liquid 1	2	
Incubation Temperature 1	40	
Min. Elapsed Time 1	0	
Max. Elapsed Time 1	0	
Wash 2	00	
Dispense Volume 2	0	
Liquid 2		
Incubation Temperature 2	1	
Min. Elapsed Time 2	0	
Max. Elapsed Time 2	0	
Wash 3	01	
Dispense Volume 3	300	OPD
Liquid 3	4	
Incubation Temperature 3	25	
Min. Elapsed Time 3	0	
Max. Elapsed Time 3	0	
300 ul. Read	Y	
Acid Quench Volume	300	IN SULFURIC
Acid Name	5	
Acid Bottle Location		
Negative Replicates	03	
Min. Neg. Cntl. Replicates	02	
Negative Location	A1	
Neg. Min. Absorbance	0.030	
Neg. Max. Absorbance	0.250	
Negative Aberrant (%)	50.0	
Positive Replicates	03	
Min. Pos. Cntl. Replicates	02	
Positive Location	A4	
Pos. Min. Absorbance	0.800	
Pos. Max. Absorbance	1.999	
Positive Aberrant (%)	50.0	
PC2 Replicates	00	
Min. PC2 Replicates	00	
Min. Cntl. Diff. (P-N)	0.550	
Negative Control Factor	1.000	
Positive Control Factor	0.360	
Cutoff offset	0.000	
Reactive Gray Zone (%)	0.0	
Negative Gray Zone (%)	0.0	
Reactive Definition	A	
Flagging Definition	R	
Min. Sample React. Abs	0.020	
Data Reduction Option	00	

* No caso de estar sendo utilizado o modo de identificação positiva, cada ensaio deve ter um único número de análise. Ao selecionar um ensaio a ser editado, selecionar um com número de análise que ainda não foi realizado no modo de identificação positiva. Ao usar um dispositivo de pipetagem automático, como o COMMANDER® PPC, assegurar-se de que o número do protocolo de ensaio PPC editado é destinado ao número de teste correto do pipetador.

Laboratórios usuários da versão 7.0 ou superior do software do COMMANDER[™] PPC devem processar o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, usando o protocolo de ensaio fornecido no software sem editar.

QUANTUM[™] II

Laboratórios usuários do Quantum[™] II devem ler este ensaio como segue:

Laboratórios usuários do Quantum[™] II, Módulo A, Número de Lista superior a 4045-97, devem processar o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA usando o protocolo de ensaio fornecido no software sem editar. Laboratórios usuários do Quantum[™] II, Módulo A, Número de Lista superior a 4045-96, devem criar um protocolo de ensaio editado. Editar Modo 1.17 para incluir os seguintes valores de parâmetros. Todos os outros valores não estão delimitados (N/A) para o ensaio. Verificar se os valores do protocolo editado e o nome do ensaio combinam com os valores do protocolo abaixo

PROTOCOLO QUANTUM

Name: ABBOTT CHAGAS AC EIA

FILTERS = 492 600
PATH LENGTH = 1.11

NEGATIVE CONTROLS

REPLICATION = 3
MINIMUM Δ A = 0.030
MAXIMUM Δ A = 0.250
ABERRANT VALUE OPTION = 1
ABERRANT CUTOFF = 50.00

POSITIVE CONTROLS

REPLICATION = 3
MINIMUM Δ A = 0.800
MAXIMUM Δ A = 1.999
ABERRANT VALUE OPTION = 1
ABERRANT CUTOFF = 50.00
MINIMUM VALUE = 0.550
UNKNOWN REPLICATION = 1

CUTOFF = A*NC \bar{x} + B*PC \bar{x} + C

A = 1.000
B = 0.360
C = 0.00
REACTIVE GRAY ZONE = 0.0
NEGATIVE GRAY ZONE = 0.0

DISTINCTION

REACTIVE > CUTOFF (0)
REACTIVE < CUTOFF (1)
DISTINCTION = 0
FLAGGING

REACTIVE UNKNOWN (0)
REACTIVE UNKNOWN (1)
FLAG

MIN SAMPLE REACTIVITY ABS

MIN SAMP REACT Δ A = 0.020

QUANTUMATIC[™]:

Laboratórios usuários do Quantumatic[™] devem ler este ensaio como segue:

Laboratórios usuários do Quantumatic[™], Número de Lista superior a 7523-42, devem processar o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, usando o protocolo de ensaio fornecido no software sem editar.

Laboratórios usuários do Quantumatic[™], Número de Lista 7523-42, devem criar um protocolo de ensaio editado. Editar um protocolo de ensaio editado (já existente (por exemplo, Auszyme C) para incluir os seguintes parâmetros de ensaio. Verificar se os valores do protocolo editado e o nome do ensaio combinam com os valores do protocolo e com o nome do seguinte ensaio.

PROTOCOLO QUANTUMATIC

Name: ABBOTT CHAGAS AC EIA

Cutoff Value = (1.000) NC \bar{x} + (0.360) PC \bar{x} + 0.000

P > N

No. NEG CONTROLS = 3
MIN NEG CONTROL = 0.030
MAX NEG CONTROL = 0.250
NEG ABERRANT CUTOFF % = 50.0%
No. POS CONTROL = 3
MIN POS CONTROL = 0.800
MAX POS CONTROL = 1.999
POS ABERRANT CUTOFF % = 50.0%
MIN CONTROL DIFF = 0.550
No. PATIENT REPL = 1
MIN SAMP REACT ABSORB = 0.020
REACTIVE GRAY ZONE = 0.0%
NEGATIVE GRAY ZONE = 0.0%
NO OF POS-2 CONTROLS = 0

PROCEDIMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE 19.20

1. Critério de aceitação do Branco de Substrato

- Usuários do Quantum[™] II/Quantumatic[™]: Considera-se válida uma operação de ensaios em relação ao branco de substrato, se o branco possuir um valor de absorbância maior ou igual a 0.020 e menor ou igual a 0.040. A determinação da validade do ensaio devido ao branco de substrato deve ser feita pelo usuário. O valor do branco de substrato é uma indicação da integridade da Solução de Substrato de OPD. Se a absorbância do branco de substrato estiver fora do índice aceitável, a preparação do substrato é questionável, e deve ser usado o branco de substrato alternativo. Se o branco de substrato alternativo também for inaceitável, o ensaio será invalidado e deverá ser repetido.
- Usuários COMMANDER[™] PPC: O controle de Qualidade referente ao branco de substrato é determinado automaticamente pelo COMMANDER[™] PPC, de acordo com os procedimentos descritos no Manual do Operador PPC. Se a operação for invalidada, deve-se suspeitar de erro na técnica de preparação da solução de substrato de OPD, bem como a operação deve ser repetida.

NOTA:

Ao ser usado um Quantum[™] II, Quantumatic[™] ou Parallel Processing Center, consultar o Manual do Operador apropriado para determinar quais os cálculos desenvolvidos automaticamente pelo instrumento. Se um desses instrumentos não for usado, executar os seguintes cálculos a partir dos dados do ensaio.

2. Cálculos do Controle Negativo e Critério de Aceitação

a. Cálculos dos Resultados

- Cálculo da absorbância média dos Controles Negativos (NC \bar{x}).

Determinar a média dos valores dos Controles Negativos.

Exemplo:

Amostra No.	Absorbância
1	0.100
2	0.096
3	0.110
TOTAL	0.306

$$(NC\bar{x}) = \frac{\text{Absorbância Total}}{3} = \frac{0.306}{3} = 0.102$$

$$\begin{aligned} \text{Valor do Cut-off} &= 0,102 + (0,360 \times 1,600) \\ &= 0,102 + 0,576 \\ &= 0,678 \end{aligned}$$

2. Cálculo da Amostra

A presença ou ausência de anticorpo *T. cruzi* é determinada relacionando-se o valor da absorbância da amostra indeterminada com o Valor do Cut-off. Se a absorbância da amostra for maior ou igual ao Valor do Cut-off, a mesma é considerada reativa pelo critério do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. Amostras com valores de absorbância iguais ou superiores a 0,020, porém inferiores ao Valor do Cut-off, são consideradas reativas e podem ser consideradas negativas para a presença do anticorpo contra o *T. cruzi* pelo critério do Kit ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA.
2. Amostras com valores de absorbância abaixo de 0,020 devem ser reanalisadas usando o mesmo produto e metodologia de teste, a fim de verificar o resultado do teste inicial, bem como deve-se suspeitar das técnicas empregadas. Se, ao ser realizada, a amostra apresentar um valor de absorbância menor do que o Valor do Cut-off, a mesma pode ser considerada negativa para a presença de anticorpos contra o *T. cruzi*, de acordo com os critérios do Kit ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. Não são necessários mais testes.
3. Amostras cujos valores de absorbância forem maiores ou iguais ao Valor do Cut-off, são consideradas inicialmente reativas para a presença de anticorpos contra o *T. cruzi* pelos critérios do Kit ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, e devem ser repetidas em duplicata, antes da interpretação final dos resultados, usando-se a mesma amostra e metodologia de teste. Caso uma das duplicatas seja reativa, a amostra é considerada reativamente para anticorpos contra o *T. cruzi*.
4. Amostras inicialmente reativas devem ser repetidas em duplicata, usando o mesmo produto e metodologia de teste. Se ambas as duplicatas dos testes de repetição forem negativas, a amostra será considerada negativa para os anticorpos contra o *T. cruzi*, de acordo com os critérios do Kit ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. Se a duplicata for não-reativa e o resultado do ensaio inicial for moderadamente ou altamente reativo, recomenda-se uma investigação.
5. Recomenda-se que as amostras reativamente reativas sejam investigadas por análises diagnósticas adicionais.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. O diagnóstico da doença de Chagas deve ser baseado numa combinação de resultados incluindo histórico clínico, apresentação do parasita e outras análises sorológicas.
2. O ensaio ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, bem como a seção INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS devem ser seguidos rigorosamente, quando as amostras de soro ou plasma forem analisadas para a presença de anticorpo contra o *T. cruzi*. Como este ensaio EIA foi destinado a amostras individuais de soro ou plasma, não existem dados disponíveis suficientes para interpretar testes executados em amostras de outros fluidos biológicos, pool de sangue, ou plasma processado, ou produtos feitos de tais pools; a análise dessas amostras não são recomendadas.
3. Não existem dados disponíveis para interpretar resultados utilizando-se amostras de cadáveres ou outros fluidos biológicos, tais como urina, saliva ou fluido pleural. Não usar amostras inativadas por calor.
4. Um resultado negativo do ensaio não elimina a possibilidade de exposição ou uma infecção recente com *T. cruzi*. O anticorpo não é prontamente detectado durante os estados iniciais de infecção aguda, e podem não aparecer por até 20 - 40 dias após a infecção. Resultados negativos desse ensaio em indivíduos com exposição prévia ao *T. cruzi* podem ser devidos aos níveis de anticorpos estarem abaixo do limite de detecção do mesmo.
5. Se a amostra for reativamente reativa, a probabilidade de que anticorpos contra o *T. cruzi* estejam presentes é alta, especialmente em amostras obtidas de indivíduos com risco crescente a infecção por *T. cruzi*. A interpretação de resultados das amostras que demonstraram ser reativamente reativas pelo EIA e negativas ou indeterminadas em análises adicionais não é clara; bem como deve ser obtido esclarecimento pela análise de uma outra amostra do mesmo paciente, obtida de três a seis meses mais tarde.
6. Resultados falsamente reativos com o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA demonstraram ocorrer em amostras de indivíduos, que foram recentemente vacinados para influenza.
7. Embora sejam detectados ambos IgG e IgM, a especificidade do ensaio é aproximadamente 100 vezes maior para IgG do que para IgM.

VALORES ESPERADOS

Das 707 amostras de soro de indivíduos de baixo-risco, dos E.U.A., escolhidos ao acaso, de duas localidades geograficamente distintas (Califórnia e Wisconsin), 1 (0,14%) amostra foi reativamente reativa para anticorpos contra o *T. cruzi* pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. Entre 565 amostras de plasma de indivíduos de baixo-risco, dos E.U.A., escolhidos ao

- b. Critério de Aceitação do Controle Negativo
Os valores individuais dos Controles Negativos devem satisfazer os seguintes critérios:
- 1) Os valores Individuais dos Controles Negativos devem ser menores ou iguais a 0,250 e maiores ou iguais a 0,030.
 - 2) Os valores individuais dos Controles Negativos devem estar dentro do índice de 0,50 a 1,5 vezes a média dos Controles Negativos.

Se um valor estiver fora destes critérios, desprezar este valor e recalcular a média. Todos os valores remanescentes dos controles negativos devem satisfazer os critérios acima ou o ensaio será invalidado e deverá ser repetido.

3. Cálculos dos Controles Positivos e Critérios de Aceitação

a. Cálculos dos Resultados

- 1) Cálculo da absorbância média dos Controles Positivos (PC \bar{x})

Determinar a média dos valores dos Controles Positivos

Exemplo:

Controle Positivo Amostra No	Absorbância
1	1,615
2	1,535
3	1,650
TOTAL	4,800

$$(\text{PC}\bar{x}) = \frac{\text{Absorbância Total}}{3} = \frac{4,800}{3} = 1,600$$

b. Critérios de Aceitação dos Controles Positivos

- 1) Os valores individuais dos Controles Positivos devem ser menores ou iguais a 1,999 ou maiores ou iguais a 0,800.
- 2) Os valores individuais devem estar entre 0,5 e 1,5 vezes a média dos Controles Positivos.
Se um dos valores estiver fora destes critérios desprezar este valor e recalcular a média. Todos os valores remanescentes dos controles Positivos devem obedecer os critérios acima ou o ensaio será invalidado e deverá ser repetido.

4. Critério de Validade do Ensaio

Para que o ensaio seja considerado válido, a diferença entre a média da absorbância dos Controles Positivo e Negativo (P-N) deve ser 0,550 ou maior. Caso contrário, deve-se suspeitar da técnica aplicada ou de deterioração do reagente, bem como o ensaio deverá ser repetido.

Cálculos para Determinação de P - N:

Exemplo:

$$\begin{aligned} \text{NC}\bar{x} &= 0,102 \\ \text{PC}\bar{x} &= 1,600 \\ \text{P - N} &= (1,600 - 0,102) = 1,498 \end{aligned}$$

RESULTADOS

1. Cálculo do Valor do Cut-off
O Valor do Cut-off é a absorbância média do Controle Negativo mais 0,360 vezes a absorbância média do Controle Positivo.

$$\text{Valor do Cut-off} = \text{NC}\bar{x} + (0,360 \times \text{PC}\bar{x})$$

Exemplo:

$$\begin{aligned} \text{NC}\bar{x} &= 0,102 \\ \text{PC}\bar{x} &= 1,600 \end{aligned}$$

caso, de duas localidades geograficamente distintas (Califórnia e Wisconsin). 4 (0,71%) amostras foram repetidamente reativas para anticorpos contra o T. cruzi pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA

Das 2.260 amostras de soro de indivíduos de baixo-risco da América Central, escolhidos ao acaso (amostras obtidas de Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua), testadas num único local 34 (1,50%) foram repetidamente reativas para anticorpos contra o T. cruzi pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. Todas as 34 amostras demonstraram conter anticorpos específicos contra T. cruzi por um ensaio de Radioimunoprecipitação (RIPA)²¹ (Tabela III).

Numa população selecionada de 13 amostras xenodiagnosticadas positivas, todas as 13 (100%) amostras foram repetidamente reativas para anticorpos contra o T. cruzi pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA (Tabela VI).

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO FUNCIONAMENTO

A. PRECISÃO

1. A reprodutibilidade do ensaio foi determinada em dois estudos, analisando-se cinco amostras em replicatas de cinco, em três operações consecutivas, num total de três locais, utilizando-se métodos tanto manual (Quantum™ II) quanto automatizado (COMMANDER™). Foi usado um total de três lotes de material para se calcular o Desvio Padrão (SD) e o Coeficiente de Variação (%CV) intra-lote. Foram calculados os SD e %CV intra-ensaio, inter-ensaio e inter-lote (Tabela I). A média de S/C O é definida como a Absorvância Média da Amostra (A492) dividida pelo Valor do Cutoff calculado (CO).

2. A reprodutibilidade foi determinada por dez matrizes de amostras diferentes. Para cada matriz de amostra foram analisadas dez amostras não-reativas e dez amostras com valores próximos ao do Cutoff, por seis vezes, em replicatas de três. Foram calculados os índices do %CV intra-ensaio e inter-ensaio para cada matriz de amostra (Tabela II).

TABELA I
REPRODUTIBILIDADE DO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA

Estudo 1 - Manual	Painel Membro	N	Média S/C O	Intra-ensaio		Inter-ensaio		Inter-lote	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
	Alto	513	2,044	0,1782	8,7	0,3733	18,3	0,3823	18,7
	Médio	513	1,822	0,1205	7,9	0,1771	11,6	0,2049	13,5
	Baixo	512	1,150	0,0918	8,0	0,1341	11,7	0,1444	12,6
	Incerto	513	0,996	0,0855	8,6	0,1220	12,2	0,1294	13,0
	Negativo	509	0,379	0,0324	8,5	0,0479	12,6	0,0520	13,7
	Controle	N	Média 492	Intra-ensaio		Inter-ensaio		Inter-lote	
	Negativo	69	0,111	0,0085	7,7	0,0112	10,1	0,0219	19,7
	Positivo	69	1,411	0,0739	5,2	0,0808	5,7	0,1921	13,6
	Estudo 2 - Automatizado	N	Média S/C O	Intra-ensaio		Inter-ensaio		Inter-lote	
	Alto	81	2,129	0,1644	7,7	0,1843	8,7	0,1843	8,7
	Médio	81	1,554	0,0883	5,7	0,1181	7,5	0,1362	8,8
	Baixo	81	1,179	0,0767	6,5	0,0996	8,4	0,1168	9,9
	Incerto	81	1,024	0,0667	6,5	0,0786	7,7	0,0946	9,2
	Negativo	81	0,392	0,0258	6,6	0,0281	7,4	0,0361	9,2
	Controle	N	Absorvância Média 492	Intra-ensaio		Inter-ensaio		Inter-lote	
	Negativo	81	0,130	0,0085	7,7	0,0112	10,1	0,0219	19,7
	Positivo	81	1,558	0,1184	7,6	0,1317	8,5	0,1925	12,4

TABELA II
REPRODUTIBILIDADE DO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA EM DEZ MATRIZES DE AMOSTRAS

Matrizes de Amostras	Amostras não-reativas		Amostras Cutoff	
	Índices de %CV Intra-ensaio	Índices de %CV Inter-ensaio	Índices de %CV Intra-ensaio	Índices de %CV Inter-ensaio
Plasma Acido-Citrato-Dextrina	7,4 - 19,1	13,9 - 28,1	5,9 - 16,1	10,0 - 21,4
Plasma com Citrato de Sódio Temponado	10,3 - 30,2	20,2 - 60,6	4,9 - 10,3	8,6 - 18,3
Plasma Citrato Fosfato-Dextrina	8,0 - 16,5	18,6 - 31,3	5,8 - 10,9	7,8 - 20,9
Plasma Citrato-Fosfato-Dextrina Adenina	7,5 - 37,3	16,6 - 37,4	4,0 - 10,1	9,9 - 17,7
Plasma Citrato-Fosfato-Dextrina Dupla	7,0 - 14,2	13,1 - 27,7	3,7 - 8,2	9,8 - 16,4
Plasma EDTA	7,0 - 20,1	14,6 - 32,5	3,8 - 14,4	9,1 - 26,4
Plasma Heparina	7,2 - 34,1	14,2 - 38,7	5,0 - 8,7	6,9 - 15,8
Plasma Oxalato de Potássio	10,9 - 20,0	18,5 - 35,8	4,1 - 9,4	6,9 - 19,3
Soro	11,6 - 30,2	28,0 - 53,1	4,5 - 11,9	21,2 - 40,2
Tubo Separador de Soro	8,3 - 17,8	21,0 - 30,3	5,1 - 10,6	8,8 - 17,9

B. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE

No momento, não existe padrão conhecido para estabelecer a presença de anticorpos contra o T. cruzi em sangue humano. A especificidade relativa é baseada em ensaios de amostras de soro e plasma provenientes de populações de baixo-risco nos E.U.A., escolhidas ao acaso (Califórnia and Wisconsin).

A sensibilidade aos anticorpos contra T. cruzi foi calculada baseando-se em ensaios de amostras xenodiagnosticadas positivas para a Doença de Chagas, e amostras positivas por hemaglutinação indireta, provenientes de pacientes com Doença de Chagas clinicamente diagnosticada.

Os estudos ABBOTT mostram que:

1. A especificidade relativa, baseada numa prevalência zero de anticorpo contra o T. cruzi, em doadores de baixo risco, escolhidos ao acaso nos E.U.A. (Califórnia e Wisconsin), é estimada em 99,69% (1267/1271) com 95,0% de intervalo de confiança de: 98,20% - 99,91% (Tabela III).
* Nestes cálculos, uma amostra individual foi repetidamente reativa e demonstrou possuir anticorpos específicos contra o T. cruzi através de um procedimento interno RIP²¹. Esta amostra foi excluída dos cálculos.
2. Foram detectados anticorpos contra T. cruzi em amostras de populações de baixo-risco, obtidas de cinco países da América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua), com um índice significativamente mais alto (1,50%) (2226/2260) com um intervalo de confiança de 97,90 - 98,96% do que os na população de baixo-risco dos E.U.A. (0,39%) (Tabela III).
3. Num grupo de 44 amostras de baixo-risco de América Central, as quais foram testadas pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, pelo Ensaio de Hemaglutinação Indireta (IHA) e pelo Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFA), a concordância acordo relativo do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA com o IFA foi 59,00% (26/44) e com o IHA foi de 65,91% (29/44), com um intervalo de confiança de 95,00% de 43,25 - 73,66% e 50,00 - 79,51%, respectivamente (Tabela IV).
4. A especificidade relativa do anticorpo contra o T. cruzi numa população politransfundida da América Central é estimada em 99,53% (211/212), com um intervalo de confiança de 95,00% de 97,40 - 99,92% (Tabela V). Das 220 amostras testadas por IHA e pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, oito foram reativas e 212 não-reativas ao IHA. Houve uma amostra que foi reativa ao EIA e não-reativa ao IHA. Ela foi removida da população de amostras negativas ao IHA (212) para estimar o número de amostras negativas ao EIA (211).
5. A sensibilidade relativa do anticorpo contra o T. cruzi, numa população selecionada de 311 amostras positivas para Chagas (previamente selecionadas como positivas pelo ensaio de Hemaglutinação Indireta (IHA)), proveniente de uma área endêmica, é estimada em 100,00% (311/311), com um intervalo de confiança de 95,00% de: 95,04 - 100,00% (Tabela V).
6. A sensibilidade do ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA foi equivalente a um teste ELISA previamente aprovado e um teste comercial de investigação IHA numa população xenodiagnosticada positiva. (13/13 para uma sensibilidade estimada de 100,00% com um intervalo de confiança de 95,00% de: 79,42 - 100,00% (Tabela VI)).
7. A sensibilidade equivalente com um ensaio Chagas IgG ELISA previamente aprovado e um IHA foi demonstrada pela análise de diluições seriadas de uma amostra xenodiagnosticada positiva (Tabela VII).

C. REATIVIDADE EM POPULAÇÕES DE BAIXO-RISCO ESCOLHIDAS AO ACASO

Os resultados das análises de amostras provenientes de indivíduos de baixo-risco, escolhidos ao acaso para anticorpos contra T. cruzi são demonstrados nas Tabelas III e IV. Os dados incluem 1272 amostras obtidas de duas localidades nos E.U.A.

(Califórnia e Wisconsin) e 2260 amostras obtidas de localidades em cinco países na América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua).

Das 2260 amostras provenientes da América Central, analisadas pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, 21 foram positivas tanto pelo EIA como pelo IHA. Dessas amostras, 17 foram positivas por IFA, 2 foram negativas pelo IFA e 2 não estavam disponíveis para análise IFA. Quinze amostras demonstraram ser discordantes, quando comparadas ao ensaio IHA (Tabela V). Dessas 15, 14 foram negativas pelo IFA, e 1 não estava disponível para análise por IFA.

TABELA III
ESPECIFICIDADE RELATIVA DE ANTICORPOS CONTRA O T. CRUZI
EM AMOSTRAS DE SORO E PLASMA,
DE POPULAÇÕES DE BAIXO-RISCO ESCOLHIDAS AO ACASO,
PELO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, ENSAIO
DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (IHA) E CHAGAS IgG ELISA.

Grupo de Amostra	ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA		Positiva p/ IHA ^a	Positiva p/ Chagas IgG ELISA
	Número de Indivíduos Testados	Repetidamente Positivo		
Soro de indivíduos de baixo-risco escolhidos ao acaso nos E.U.A. (2 localidades)	707	1 (0,14%)	0/100(0,00%)	0 (0,00%)
Plasma de indivíduos de baixo-risco, escolhidos ao acaso nos E.U.A. (2 localidades)	565	5 (0,89%)	4 (0,71%)	NT ^c
Total E.U.A. (2 localidades)	1272	6 (0,47%)	5 (0,39%)	0 (0,00%)
Soro de indivíduos de baixo-risco, escolhidos ao acaso na América Central (1 localidade)	2260	48 (2,12%)	34 (1,50%)	34 (1,02%)
TOTAL DE AMOSTRAS (3 localidades)	3.952	54 (1,53%)	35 (0,99%)	23/2360 (0,98%)

^a Um indivíduo dos E.U.A. demonstrou possuir anticorpos específicos ao T. cruzi pelo método de investigação RIPA². Quatro indivíduos dos E.U.A. demonstraram ser não-reativos pelo método de investigação RIPA². Quando o primeiro indivíduo foi removido do total do cálculo, a especificidade relativa foi de 1267/1271 = 99,69%. Todos os 34 indivíduos da América Central demonstraram possuir anticorpos específicos contra o T. cruzi, pelo método de investigação RIPA².

^b Foi executada análise IHA em 100 amostras de uma localidade dos E.U.A. com um teste comercial não licenciado.

^c Não analisado.

^d Amostras obtidas de doadores de cinco países de América Central foram analisadas numa única instituição.

TABELA IV
AMOSTRAS DE BAIXO-RISCO DA AMÉRICA CENTRAL,
TESTADAS PELO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, ENSAIO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFA) E ENSAIO DE
HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (IHA)

Resultado das Análises	Número de Amostras Testadas	Número de Amostras Positivas p/IFA		Número de Amostras Positivas p/EIA ou IHA Não Testadas	
		Positivas p/IFA	Negativas p/IFA	Positivas p/EIA ou IHA	Não Testadas
EIA Pos-IHA Pos	21	17	2	2	2
EIA Pos-IHA Neg	13	0	13	0	0
EIA Neg-IHA Pos	2	0	1	1	1
EIA Neg-IHA Neg	8	0	8	0	0

^a = Três amostras não estavam disponíveis para análise IFA.

D. REATIVIDADE EM POPULAÇÕES DE PACIENTES

A reatividade do ensaio ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA foi determinada pela análise de amostras provenientes de pacientes na América Central, os quais eram de risco para doença de Chagas transmitida por transfusão, após múltiplas transfusões (politransfundidos), e um grupo de pacientes inicialmente determinado como positivo por IHA, numa área endêmica da América do Sul (Tabela V).

Foram testadas amostras de 220 pacientes politransfundidos, numa localidade da América Central, com um ensaio IHA comercialmente disponível na América Central, e pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA. As amostras positivas por IHA e repetidamente reativas ao ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA foram testadas pelo ensaio IFA.

Uma população de 311 amostras (da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai) de pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da doença de Chagas, e previamente confirmados positivos ao anticorpo contra o T. cruzi com um ensaio IHA não comercial de uma localidade da América do Sul foi reanalisada com um ensaio IHA comercialmente disponível na América do Sul (Polychaco), ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA e Chagas IgG ELISA. Todas as amostras foram determinadas como possuindo anticorpos específicos contra o T. cruzi pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA e sensibilidade equivalente quando testadas com um ensaio Chagas IgG ELISA comercialmente disponível.

Foram testadas amostras de 13 indivíduos xenodiagnosticados positivos, provenientes da Argentina, usando o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA, um ensaio IHA comercial da América do Sul e um Chagas IgG ELISA. Todas as 13 amostras foram repetidamente reativas ao ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA (Tabela VI). Uma amostra xenodiagnosticada positiva foi diluída serialmente em plasma negativo para o anticorpo contra o T. cruzi e testada por todos os três métodos. Essa amostra exibiu reatividade detectável no ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA na quinta (E) diluição (Tabela VII).

TABELA V
ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE RELATIVAS
DE ANTICORPOS CONTRA O T. CRUZI EM AMOSTRAS
DE PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS NA AMÉRICA CENTRAL,
E AMOSTRAS IDENTIFICADAS COMO POSITIVAS
PELO ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (IHA), PROVENIENTES
DA AMÉRICA DO SUL.

Grupo	ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA		Positiva p/ IHA	Positiva p/ Chagas IgG ELISA
	Número Testado	Inicialmente Reativo		
Pacientes Politransfundidos	220	9 (4,09%)	6 ^a (2,73%)	NT ^b
Pacientes Positivos p/ IHA	311	311 (100,00%)	311 (100,00%)	287/310 (92,58%)

^a Cinco das amostras de pacientes politransfundidos foram positivas por IHA.

^b Não analisado.

^c Todas as 311 amostras foram inicialmente selecionadas como positivas por IHA e possuíam anticorpos detectáveis contra o T. cruzi, por ensaios de investigação.

^d Foram executadas repetições por IHA em 310 amostras inicialmente positivas, com um ensaio comercial IHA diferente do método de análise inicial. Uma amostra testada pelo ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA não estava disponível para repetição de análise IHA.

^e A sensibilidade foi de 309/309 = 100,00% com um intervalo de confiança de 95,00 % de 99,04 - 100,00%. Duas amostras foram equivocadas pelo Chagas IgG ELISA e não foram incluídas no cálculo.

TABELA VI
SENSIBILIDADE DO ANTICORPO CHAGAS/IACO,
PELO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA,
EM AMOSTRAS XENODIAGNOSTICADAS POSITIVAS PARA CHAGAS

Número de Amostras Xenodiagnosticadas Positivas	Número de Amostras Positivas para o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA		Número de Amostras Positivas p/ IgG ELISA
	Positivas	13 ^a	
13	13	12	12

^a Sensibilidade de 100,00% com um intervalo de confiança de: 79,42 - 100,00%

II. OUTRAS DOENÇAS PARASITÁRIAS E ANÁLISES DE ESTADOS DE DOENÇAS POTENCIALMENTE INTERFERENTES

Amostras de 308 pacientes com outras doenças clinicamente diagnosticadas parasitárias ou infecciosas, ou com estados de doença potencialmente interferente, caracterizadas em laboratório, foram testadas com o ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA (Tabela VIII).

TABELA VII
DESEMPENHO DO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA EM DILUIÇÕES SÉRIAS DE UMA AMOSTRA XENODIAGNOSTICADA POSITIVA PARA CHAGAS, VERSUS UM ENSAIO CHAGAS IgG ELISA COMERCIALMENTE DISPONÍVEL, E POR ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (IHA)

Amostras Xenodiagnosticadas	ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA		Chagas IgG ELISA		IHA (+/-)
	Aborbância ^a	SICO	Aborbância ^{ab}	SICO	
Pure ^a	1,520	2,380	0,780	1,364	+
A	1,430	2,220	0,695 ^b	1,215	+
B	1,765	2,741	0,530 ^c	0,927	+
C	1,481	2,300	0,488	0,853	±
D	1,088	1,689	0,415	0,726	-
E	0,741 ^b	1,151	0,461	0,806	-
F	0,483	0,750	0,306	0,535	-
Cutoff	0,644		0,572		

^a Diluições sérias em plasma humano normal, soronegativo para *T. cruzi*.

^b Diluição considerada altamente positiva ou repetidamente reativa está sublinhada ou em negrito.

^c Equivocada.

TABELA VIII
REATIVIDADE DO ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA EM AMOSTRAS DE POPULAÇÕES SELECIONADAS DE DOENÇAS POTENCIALMENTE INTERFERENTES

Grupo	ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA	
	Número Testado	Repetidamente Relativa (%)
ANA	12	0,0
CMV	6	0,0
Dálise	6	0,0
EBV	6	0,0
Hemolítico	6	0,0
Hemolisado	5	0,0
HSV Tipo I	5	0,0
Hipogamaglobulinémico	5	0,0
Hipergamaglobulinémico	5	20,0
ictérico	5	0,0
14	14	100,0
Vacinação Influenza		
Leishmaniose	10	0,0
Mucocutânea	16	0,0
Cutânea	6	0,0
Visceral	5	0,0
Lipêmico	8	0,0
Malária	11	0,0
Mioma Múltiplo	6	0,0
Mulheres Multiparas	6	0,0
Gamopatia Monoclonal	5	0,0
Esclerose Múltipla	100	5,0 ^a
Paracoccidiodomicose	5	0,0
Falor Reumatoide	20	0,0
Esquistossomiose	5	0,0
Sífilis (<i>T. pallidum</i>)	11	0,0
Toxoplasmose	14	0,0
<i>T. rangeli</i>	5	0,0
VZV	5	0,0
TOTAL	308	6,49

^a Uma amostra foi clinicamente diagnosticada como portadora da Doença de Chagas. Três amostras demonstraram possuir anticorpos específicos contra o *T. cruzi* por um ensaio RIPA²¹ in vitro e uma amostra não foi testada por este último ensaio.

BIBLIOGRAFIA

1. Brenner Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol. 27: 347-382, 1973.
2. Anonymous. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Tech. Rep. Series 811: 1-95, 1991.
3. Tanowitz HB, Kirchhoff, LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM and Wintner M. Chagas disease. Clin. Microbiol. Rev. 5: 400-419, 1992.
4. Leiguarda R, Roncoroni A, Taratuto AL, Jost M, Berthier M, Nogueira M and Frenth JH. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) in immunosuppressed patients. Neurology 40: 850-851, 1990.
5. Koberle F. Pathogenesis of Chagas disease. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chagas disease*. Ciba Foundation New Symposium. No. 20. pp. 137-159, 1974.
6. Segura EL. Xenodiagnosis. In *Chagas disease vectors*. Vol. 1. Taxonomic, ecological, and epidemiological aspects. RR Brenner and A. de la M. Sotia (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 41-45, 1987.
7. Scott MT, and Snary D. American trypanosomiasis (Chagas disease). In *Immunology of Parasitic Infections*, S Cohen, and KS Warren (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. pp. 261-298, 1982.
8. Fife EH Jr. and Muschel LH. Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 540-543, 1969.
9. Segura EL, Perez AC, Yanovsky JF, Andrade J, and Wymne de Martin GJ. Decrease in the prevalence of infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) in young men of Argentina. Bull. Pan. Am. Health Organ. 19: 253-264, 1985.
10. Pan AA, Rosenberg GB, Hurley MK, Schock GJH, Chu, VP, and Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease). J. Infect. Dis. 165: 585-588, 1992.
11. U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. HHS Publication (NIH) 88-8395. Washington: U.S. Government Printing Offices, May, 1988.
12. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. Geneva. World Health Organization, 1983.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue. Tentative guideline. NCCLS Document M29-T. Villanova, PA.: NCCLS, 1989.
14. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health care settings. MMWR 36, Supplement No. 2S, 1987.
15. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, and Mehnick JL. Immunological and biophysical alteration of Hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. Appl. and Envir. Microbiol. 42: 762-767, 1981.
16. Bond WW, Favero MS, Peterson NJ, and Ebert JW. Inactivation of Hepatitis B virus by intermediate-to-high level disinfectant chemicals. J. Clin. Microbiol. 18: 535-538, 1983.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Laboratory hazardous waste; Proposed guideline. NCCLS Document GP5-P. Villanova, PA.: NCCLS, 1986.

18. U.S. Environmental Protection Agency. EPA guide for infectious waste management. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Publication No. EPA/530-SW-56-014, 1986.

19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Specifications for immunological testing of infectious disease; Proposed guideline. NCCLS Document LA 18-P. Villanova, PA.: NCCLS, 1991.

20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control testing: Principles and definition. Approved guideline. NCCLS Document C24-A. Villanova, PA.: NCCLS, 1990.

21. Pan, A. (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) Memo to: M. Spiewak. 1994 Sep 8. 2 leaves. A confirmed result is defined as reactive to at least 2 of the 3 following bands: 32, 34, 90 kDa.

Reg. MS nº
Resp. Téc.: Farm. Kaoru Ishizaki
CRF-SP nº 5578

Fabricado por:
ABBOTT LABORATORIES
ABBOTT PARK, ILL 60064
U.S.A.

Distribuido por:
ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA.
Rua Nova York, 245
São Paulo - SP
C.G.C. nº 45.998.701/0001-16

DD 221-1A
11-E-010-01