

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Roberto Machado Do Passo

**CONFECÇÃO DE PAINEL PARA CONTROLE DA QUALIDADE DE CONJUNTOS
DE DIAGNÓSTICO DE USO “IN VITRO” EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Rio de Janeiro

2008

CONFECÇÃO DE PAINEL PARA CONTROLE DA QUALIDADE DE CONJUNTOS
DE DIAGNÓSTICO DE USO "IN VITRO" EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Roberto Machado Do Passo

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação da Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientação: Prof^a Helena Cristina B. Guedes Borges

Rio de Janeiro

2008

Passo, Roberto Machado do

Confecção de painel para controle da qualidade de conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” empregados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas / Roberto Machado do Passo. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008.

58 f.; il, tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados a Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.
Orientadora: Helena Cristina Balthazar Guedes Borges.

1. Controle de Qualidade. 2. Doença de Chagas. 3. Conjuntos de diagnóstico
I. Título.

CONFECÇÃO DE PAINEL PARA CONTROLE DA QUALIDADE DE CONJUNTOS
DE DIAGNÓSTICO DE USO “IN VITRO” EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.

Roberto Machado do Passo

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação da Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof.^a. Lúcia Maria Correa Werneck (Mestre)

INCQS – FIOCRUZ

Prof. Dr. Antonio Eugênio C.C. de Almeida (Doutor)

INCQS - FIOCRUZ

Prof.^a. Helena Cristina B. G. Borges (Mestre) - Orientadora

INCQS – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2008

Agradeço ao Senhor
Jesus a Benção de ter
conseguido a Realização
desta Monografia

AGRADECIMENTOS

- Ao INCQS pela oportunidade desta Pós-Graduação.
- A chefia do Laboratório de Sangue e Hemoderivados, Marisa Adati.
- Aos colegas do laboratório por cumprirem minhas tarefas durante a monografia.
- A colega Maria Aparecida Boller o apoio à minha inscrição nesta Especialização.
- A minha querida esposa e companheira pela colaboração e incentivo.
- E principalmente a minha colega de longa data e orientadora Helena Guedes que por sua formação pessoal e profissional foi capaz de me ensinar, motivar e aturar, apesar de todas as suas atribuições.

RESUMO

O monitoramento efetivo dos conjuntos diagnósticos de uso “in vitro”, para fins de registro e conseqüente comercialização do produto no país encontra-se regulamentado por força de legislação sanitária tornando obrigatória à avaliação da sua qualidade antes dos mesmos serem disponibilizados no mercado nacional. A diversidade dos conjuntos diagnósticos disponibilizados a cada ano e sua variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade, justificam a importância do controle da qualidade desses produtos. Neste contexto, o INCQS vem analisando sistematicamente conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” através de análise prévia, fiscal e de controle em atendimento a demanda da ANVISA com o desafio de garantir a confiabilidade dos produtos comercializados e conseqüentemente a qualidade do sangue utilizado no país. Este trabalho teve por objetivo a confecção de um painel a ser empregado na avaliação da sensibilidade e especificidade clínica dos conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” utilizados na triagem e confirmação sorológica da doença de Chagas. Para confecção do referido painel foram utilizadas unidades de plasma obtidas no período de janeiro de 2001 a junho de 2006 provenientes de Serviços de Hemoterapia das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país. A metodologia adotada foi à análise retrospectiva dos registros internos do LSH e do Sistema de Gerenciamento de Amostras do INCQS. Das 95 unidades de plasma encaminhadas ao INCQS foram selecionadas 84 viáveis. Destas, 39 apresentaram resultados reagentes, 42 foram não-reagentes, 3 apresentaram resultados inconclusivos nos testes ELISA. Sendo assim, 39 unidades seguiram um fluxo de ensaios compreendendo na totalidade 3 testes ELISA, uma hemaglutinação, uma aglutinação, uma imunofluorescência e um Western Blot para melhor caracterização, confirmação e seleção para composição do painel. Os resultados apresentados neste trabalho resultam na confecção de um painel de 39 amostras de plasma de baixa e média reatividade para Chagas como uma ferramenta de uso potencial na ampliação da capacidade analítica do LSH no controle de qualidade dos conjuntos para diagnóstico da doença de Chagas.

PALAVRAS-CHAVE - doença de Chagas, Conjuntos Diagnósticos, Controle da Qualidade, painel.

ABSTRACT

The effective monitoring of “in vitro” diagnosis kits to register and consequent products commercialization in the country are regulated by sanitary legislation making obligatory the quality evaluation before available in the national market. The kit diversity available in each year and its variability of sensitivity and specificity justify the importance of the quality control of these products. In this context, INCQS has been systematically analyzing the diagnosis kits of use “in vitro” through previous analysis, fiscal and control to attend ANVISA’s demand with the challenge of assuring the commercial products reliability and consequently, the blood quality used in the country. This work had the objective of manufacturing the panel to be employed in the evaluation of the clinical sensitivity and specificity of the diagnosis kits used in the trial and serological confirmation of Chagas Disease. To the manufacturing of the panel, were used plasma unities obtained in the period of January 2001 up to June 2006 from Hemotherapy Service of North, Norwest, Middle-East and South-East regions to the country. The methodology adopted was retrospective analysis of LSH internal register and of the INCQS Management Sample System. Of 95 plasma unities sent to INCQS were selected 84 feasible. From those, 39 performed positively, 42 performed negatively, 03 performed inconclusively in the ELISAs. Therefore, 39 plasma unities followed the assay flux consisting in the totality three ELISA tests, one hemagglutination assay, one agglutination assay, 01 IFI and 01 Western Blot to improve the characterization, confirmation and selection to compose the panel. The results presented in this work form the manufacturing of a panel with 39 plasma unities samples of low and medium Chagas reactivity as a potential tool used in the amplification of the LSH analytical capacity in the quality control of Chagas kits.

KEY WORDS – Chagas Disease – Diagnosis kits – Quality control - Panel.

LISTAS DE SIGLAS e ABREVIATURAS

Ag	- Antígeno
Ac	- Anticorpo
Anti-HIV-1	- Anticorpos contra o vírus do HIV-1
Anti-HIV-2	- Anticorpos contra o vírus do HIV-2
Anti-HBc	- Anticorpo contra o <i>core</i> do vírus da Hepatite B
Anti-HCV	- Anticorpo contra o vírus da Hepatite C
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNDST/AIDS	- Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
LACEN	- Laboratório de Saúde Pública
GEVIT	- Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso in vitro
HBsAg	- Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HTLV I/II	- Virus Linfotrópicos de Células T Humana I/II
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LSH	- Laboratório de Sangue e Hemoderivados
PNDST/AIDS	- Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS
POP	- Procedimento Operacional Padrão
QBC	- Quantitative Buffy Coat
RPR	- Rapid Plasma Reagine
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SGA	- Sistema de Gerenciamento de Amostras
SVS	- Secretaria de Vigilância Sanitária
<i>T. cruzi</i>	- <i>Trypanosoma cruzi</i>
VDRL	- Venereal Disease Research Laboratory
NEG	- Negativo
POS	- Positivo
≤	- Inferior ou igual
≥	- Superior ou igual
=	- Igual

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição da Doença de Chagas.....	15
Figura 2.	Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3.	Formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.....	5
Figura 4.	<i>Triatoma infestans</i>	5
Figura 5.	Sinal de Romaña.....	9
Figura 6a.	Forma tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> em sangue fresco.....	11
Figura 6b.	Forma tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> em sangue periférico corado pelo Giemsa.....	11
Figura 7.	Xenodiagnóstico.....	12
Figura 8.	Obtenção das unidades de plasma.....	18
Figura 9.	Modelo utilizado no cadastro das unidades de plasma recebidas no LSH.....	19
Figura 10	Processamento, distribuição e armazenamento das unidades de plasma.....	20
Figura 11	Caracterização das unidades de plasma	21
Figura 12	Representação esquemática do teste de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos.....	24
Figura 13	Reação de hemaglutinação Indireta	25
Figura 14	Teste de aglutinação indireta.....	26
Figura 15	Representação da tira de western blot com a presença de banda nas regiões de 200 e 120 kDa..... Reação de Imunofluorescência.....	27
Figura 16	Representação esquemática do teste de imunofluorescência.....	28
Figura 17	Reação de imunofluorescência.....	28
Figura 18	Fluxo de testagem das amostras para composição do painel	31

LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS E TABELA

Quadro 1	Mecanismos de Transmissão da doença de Chagas.....	8
Quadro 2	Conjuntos de diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do <i>T.cruzi</i>	22
Gráfico 1	Distribuição das unidades de plasma de acordo com a procedência.....	29
Gráfico 2	Distribuição das unidades de plasma recebidas de acordo com a sorologia na origem.....	30
Gráfico 3	Distribuição pelos estados de origem das unidades de plasma com sorologia reagente para doença de Chagas descrita na rotulagem encaminhada ao INCQS.....	30
Gráfico 4	Resultado da sorologia das unidades de plasma nos ensaios realizados	31
Gráfico 5	Valores de racio obtidos nos ensaios imunoenzimáticos (1, 2 e 3).....	32
Tabela 1	Sumário dos resultados da caracterização sorológica das unidades de plasma	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Histórico.....	14
1.2	Epidemiologia da Doença.....	14
1.3	O parasita.....	16
1.4	Formas de transmissão.....	18
1.5	Fases da Infecção.....	21
1.5.1	Fase Aguda	21
1.5.2	Fase Subclínica	22
1.5.3	Fase Crônica	22
1.6	O Diagnóstico da Infecção.....	23
1.6.1	O Diagnóstico Laboratorial.....	23
1.6.2	Métodos Parasitológicos.....	23
1.6.3	Métodos Sorológicos.....	26
2.	OBJETIVOS.....	29
3.	METODOLOGIA.....	30
3.1	Obtenção de unidades de plasmas.....	30
3.2	Cadastro e Identificação das Unidades de Plasma.....	32
3.3	Processamento das Unidades de Plasma.....	32
3.4	Caracterização das Unidades de Plasma.....	33
3.5	Testes Sorológicos empregados na caracterização do painel.....	36
3.5.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	36
3.5.2	Teste de Hemaglutinação Indireta.....	38
3.5.3	Teste de Aglutinação Indireta	38
3.5.4	Western Blot (WB).....	39
3.5.5	Imunofluorescência Indireta (IFI).....	40
4.	RESULTADOS.....	42
4.1	Das Unidades de Plasma Recebidas.....	42
4.1.2	Quanto à procedência	42
4.1.3	Quanto à sorologia realizada no Serviço de Hemoterapia de origem.	42
4.2	Dos Resultados Sorológicos Obtidos	44
4.2.1	Ensaio Imunoenzimáticos (ELISAs).....	45

4.2.2	Testes de Hemaglutinação Indireta e Aglutinação.....	46
4.2.3	Testes Confirmatórios	46
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	51
7.	PERSPECTIVAS.....	51
	REFERÊNCIAS	52
	GLOSSÁRIO.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descrita em 1909 por Carlos Chagas, médico e então pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), em Lassance, interior de Minas Gerais. Teria sido a primeira vez na história da medicina que um mesmo pesquisador identificava o vetor (o inseto conhecido como “barbeiro”), o agente etiológico o protozoário, *Trypanosoma cruzi*, e a doença causada por este parasita (CHAGAS, 1909a).

Originalmente, a doença de Chagas era uma enzootia de animais silvestres, onde mais de 100 espécies entre marsupiais, quirópteros, roedores, edentados, carnívoros, logomorfos e primatas albergavam o *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Por outro lado, numerosas espécies de triatomíneos silvestres se encarregavam de transmitir o *T.cruzi* entre eles, criando um ciclo silvestre de infecção. O trabalho realizado por Carlos Chagas no processo de descoberta desta doença foi demonstrar a infecção dos triatomíneos e do homem pelo *T.cruzi* (CHAGAS, 1909).

O processo de adaptação dos triatomíneos ao domicílio humano dependeu de dois fatores que se complementaram: a necessidade alimentar do barbeiro e suas mutações genéticas ao longo do tempo. Com o desmatamento e rareamento dos animais silvestres suas fontes naturais de alimentação, os triatomíneos passaram a alimentar-se dos animais domésticos e do homem, adaptando-se ao peridomicílio e ao domicílio (FORATINNI, ARAGÃO, 1980,1983). Esta adaptação mostrou-se eficiente para cerca de uma dezena de espécies e é considerado fator primordial da ocorrência e da expansão da doença de Chagas humana.

1.2 Epidemiologia da Doença

A doença de Chagas é endêmica somente no Continente Americano e é uma das moléstias de mais ampla distribuição neste continente. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas e que aproximadamente 120 milhões de pessoas vivam em áreas de risco na América Latina (WHO, 2002).

A doença de Chagas contabiliza aproximadamente 300.000 novos casos por ano sendo importante causa de mortalidade, 5.355 mortes/ano, reduzindo em 13 anos a expectativa de vida. (SILVEIRA, DUTRA, DANTAS LUNARDELLI, 2000, 2005, 2006, 2007) (FIGURA 1).

Figura 1- Distribuição da Doença de Chagas



Fonte: WHO, 2002

No Brasil existem cerca de 1.600.000 doentes crônicos e no ano de 2005 a 2007 foram registrados 283 casos de doença de Chagas aguda (BRASIL, 2007).

A principal forma de controle da doença faz-se através de ações de combate químico sistemático aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementares por rigorosa seleção de doadores de sangue (DIAS, 2007).

À medida que a transmissão por *Triatoma infestans*, o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (LORENZO, 1999), e nos países do Cone Sul: Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai foi controlada com a chamada “Iniciativa do Cone Sul”, obteve-se uma redução significativa da doença. Uruguai e Chile foram formalmente certificados como livres da transmissão da doença em 1997 e 1999, respectivamente.

No Brasil em 1997, o número de municípios cuja presença do vetor foi verificada limitou-se a pouco mais de 100 dos 711 municípios anteriormente verificados em 11 estados notificados no ano de 1983 (COURA, 2003).

Em função das ações de controle de vetores a partir da década de 80, em 9 de junho 2006 o Brasil recebeu a Certificação Internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde. Tal certificação, entretanto, representa a interrupção momentânea e não a eliminação em definitivo do principal vetor (FERREIRA, 2006).

A enfermidade a despeito das dificuldades financeiras e políticas, tem sido controlada, restando-nos ainda um horizonte de 2 a 3 décadas, necessárias para que o controle, aperfeiçoamento da vigilância e cuidado adequado aos indivíduos já infectados seja efetivamente consolidado (DIAS, 2007).

1.3 O parasita

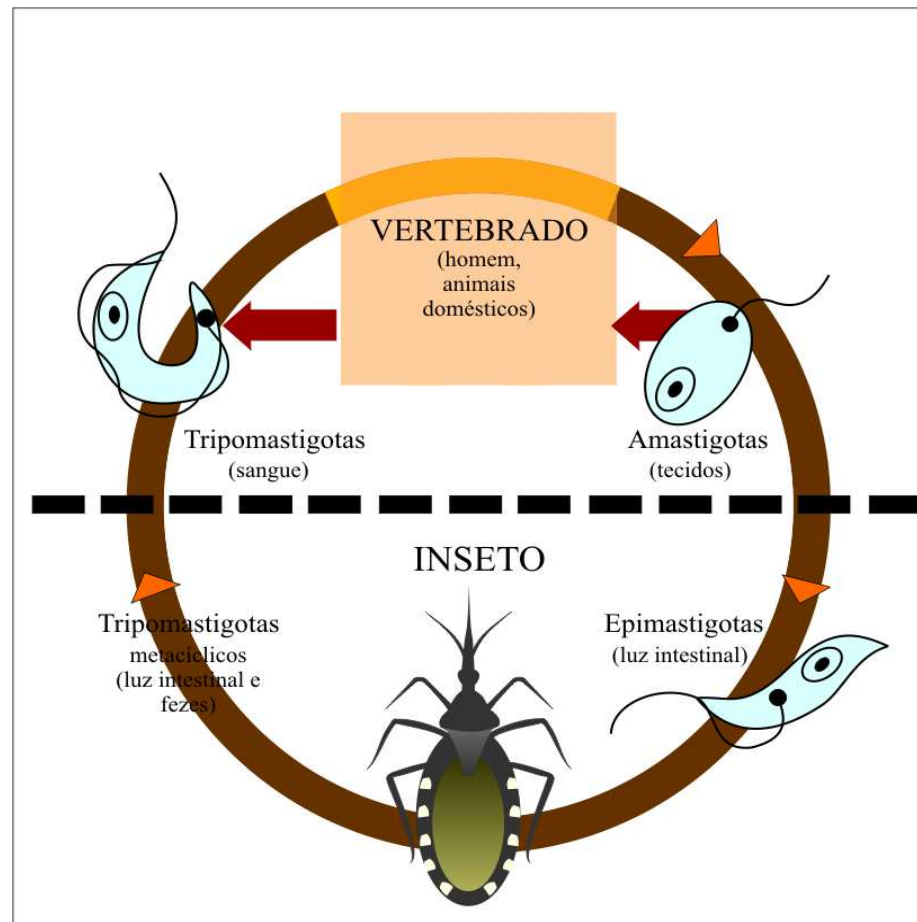
O agente etiológico da doença é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e uma mitocôndria. O parasita quando eliminado pelas fezes do barbeiro, apresenta-se na forma de uma célula alongada com um flagelo que lhe facilita o movimento, chamado tripomastigota. (FIGURA 2). Estes tripomastigotas são chamados metacíclicos, tipo ocorrente no organismo dos barbeiros. Após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, ocorre a infecção de células próximas ao local da picada. Dentro da célula, os tripomastigotas assumem uma forma ovóide e sem flagelo, chamada amastigota, a qual se multiplica rapidamente. O grande número de indivíduos provoca o rompimento celular e os tripanossomídeos entram na corrente sanguínea e no sistema linfático. Nesse momento, eles reassumem novamente a forma flagelada, sendo chamados de tripomastigotas sanguíneos (FIGURA 3 A e B), tipo ocorrente nos vertebrados. Assim, espalham-se pelo organismo e infectam mais células em novos ciclos, causando lesões principalmente em tecidos musculares cardíacos e lisos, podendo levar a graves problemas, como insuficiência cardíaca, e também ao óbito (REY, 2001).

O barbeiro, ao se alimentar do sangue de vertebrados infectados, ingere os tripomastigotas sanguíneos. No intestino médio do inseto, os tripanossomas vão se

transformar na forma epimastigota, exclusiva do hospedeiro invertebrado, e se multiplicar (FIGURA 3 A). Esta forma é parecida com a tripomastigota, entretanto o cinetoplasto, um orgânulo menor que o núcleo, encontra-se próximo a este. Nos tripomastigotas, o cinetoplasto é maior e encontra-se próximo à extremidade anterior do *T. cruzi*.

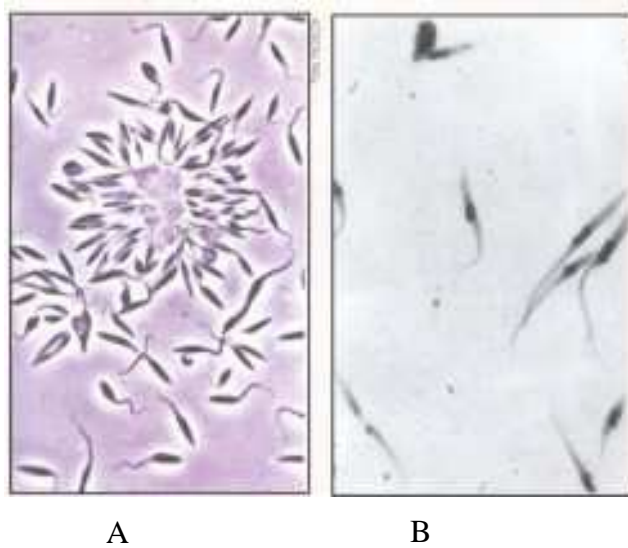
No intestino posterior do barbeiro, os epimastigotas se diferenciam para a forma tripomastigota metacíclica, tipo que será eliminado com as fezes e urina durante o repasto sanguíneo, podendo penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado por meio da picada ou mucosas, renovando assim o ciclo da transmissão (REY, 2001). (FIGURA 2)

Figura 2. Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: LSH

Figura 3: Formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas



Fonte: <http://www.fiocruz.br>

1.4 Formas de Transmissão

A transmissão natural, ou primária, da doença de Chagas é a vetorial, que ocorre através das fezes ou urina dos triatomíneos infectados, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões” (REY, LUNARDELLI., 2001, 2007) (FIGURA 4).

Figura 4 - *Triatoma infestans*



Fonte: <http://www.icb.usp.br>

Esses, ao picar os vertebrados, em geral defecam após o repasto, eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicas, presentes em suas fezes, e que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar.

Considerando que a transmissão da infecção é feita pelas fezes e pela urina dos triatomíneos, é de grande importância o tempo de defecação. Aqueles triatomíneos que defecam imediatamente após o repasto ou durante a picada, como o *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*, depositando as fezes no local da picada tem grande importância na transmissão (COURA, 2006).

No Brasil, com o fenômeno da migração rural em direção aos centros urbanos houve o surgimento da transfusão sanguínea quando indivíduos passavam a vender sangue como fonte de renda para sobrevivência (DIAS, 2002).

A transfusão sanguínea é o segundo modo mais importante de transmissão da doença de chagas na América Latina seguida da vetorial (BECERRIL, 2005). O risco da infecção via transfusão de sangue contaminado é de 12 a 25%, sendo o desafio dos Serviços de Hemoterapia identificar e excluir portadores assintomáticos e crônicos do parasita (BLEJER, 2001).

Comprovada nos anos 50 a transmissão transfusional pelo *T.cruzi* foi considerada um problema grave de saúde pública naquela época. Na década de 80, estimou-se em cerca de 20 mil o número de casos da doença anualmente no Brasil. Naquela época a sorologia pré-transfusional não era obrigatória e somente uma pequena parcela de serviços praticava a quimiprofilaxia com a violeta genciana (WHO, DIAS, 1991, 2002)

No ano de 2002, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a taxa de inaptidão sorológica brasileira para doença de Chagas era de 0,61% em bancos de Sangue.

Em 2005, Wendel estudando 13.383 amostras de soro em laboratório de referência verificou que a prevalência da infecção por *T.cruzi* em candidatos a doadores de sangue no Brasil foi cerca 0,49%. Num estudo de soroprevalência da doença em 8.228 candidatos a doação de sangue no Rio Grande do Sul, Lunardelli e colaboradores em 2007 encontrou valores semelhantes de prevalência aos verificados por Wendel em 2005.

Além dos mecanismos de transmissão vetorial e transfusional, inclui-se entre os principais a forma congênita e a oral (COURA, 2007).

A transmissão congênita ocorre, mas muitos dos conceptos têm morte prematura. No Brasil, a taxa de transmissão congênita varia de 1 a 4%. Não há ainda uma forma de prevenir a transmissão do parasito por via congênita, sendo

consenso que – para esta modalidade – a melhor estratégia é a detecção precoce do caso e seu pronto tratamento (DIAS, 2005, BRASIL, 2005).

A ocorrência de doença de Chagas aguda por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos até o ano de 2004, constituía um evento pouco conhecido ou investigado, havendo relatos de surtos localizados na região amazônica. No período de janeiro de 2005 a agosto de 2007 a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS) recebeu notificações e na maioria dessas comprovou-se a associação da ocorrência de casos ao consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina-2005 e Bahia – 2006), bacaba (Maranhão, Pará – 2006) e especialmente do açaí (Pará-2006 e 2007, Amazonas- 2007). Um total de 170 casos e 10 óbitos com letalidade de 6,5% foi verificada (BRASIL, 2007). Nos últimos 5 anos, foram notificados mais de 470 casos, quase 70% deles ocorreram na Amazônia Legal, sendo 75% no Pará. (BRASIL, 2008).

Como mecanismos secundários de transmissão estão incluídas as transmissões acidentais em laboratório, transplante de órgãos, sexuais, (esperma, fluidos menstruais) e criminalmente induzidos (COURA, 2007).

A transmissão acidental pode ser devida ao contato com a cultura do *T.cruzi*, exposição às fezes infectadas de triatomíneos ou com o sangue de paciente ou animal contendo a forma tripomastigota.

A transmissão por transplante de órgãos nas duas últimas décadas adquiriu relevância devido ao aumento do número de órgãos transplantados. O maior índice de transmissão observado, 35%, foi no transplante renal (DIAS, 2006).

A transmissão pelo leite materno apesar de relatada por Mazza e cols., e por Dias, há somente casos de suspeita descritos na literatura, sugerindo-se a reduzida importância no contexto da endemia (DIAS, 2006).

No Quadro 1 estão classificados os mecanismos de transmissão da doença de Chagas segundo Coura em 2007.

Quadro 1. Mecanismos de Transmissão da doença de Chagas

Principais	Secundários
<ul style="list-style-type: none"> • Vetores (triatomíneos) • Transfusão Sangüínea • Oral (alimentos contaminados) • Através da placenta ou do canal do nascimento 	<ul style="list-style-type: none"> • Acidentes Laboratoriais • Manipulação de Animais Infectados • Transplante de Órgãos • Sexualmente • Criminalmente induzida (oral ou inoculação)

1.5 Fases da Infecção

Na evolução natural da doença de Chagas se distinguem três fases.

1.5.1 Fase Aguda

A fase aguda, qualquer que seja a via de contágio, se inicia no momento em que se adquire a infecção e dura de dois a quatro meses, com pouca manifestação clínica e elevada parasitemia. Esta fase é mais frequente em crianças e tem como características o sinal de Romana (FIGURA 5) e o chagoma de inoculação, que aparecem após 7 a 10 dias do contato com o vetor. Logo após a fase aguda da doença vem a fase intermediária também chamada inaparente, latente ou subclínica (BRASIL, 2005a)

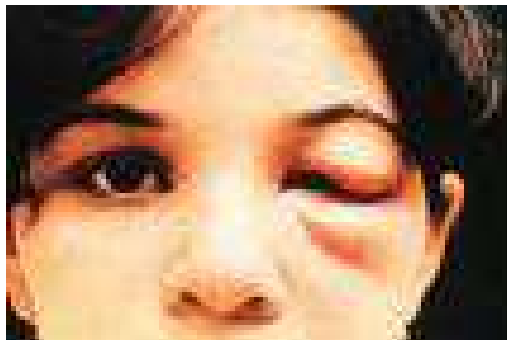
1.5.2 Fase Subclínica

É a fase de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita, onde o sistema imunológico do paciente forma a resposta imune celular e humoral. O diagnóstico clínico é difícil e os testes sorológicos geralmente são positivos. A fase intermediária é assintomática e pode perdurar por toda vida. (ARRIETA, 2004).

1.5.3 Fase Crônica

A fase crônica da doença se desenvolve em 30-40% dos pacientes infectados e é altamente incapacitante podendo induzir à falência cardíaca e à morte. Nesta fase, graças à resposta imunológica, a carga de parasitas diminui consideravelmente e os focos inflamatórios se tornam escassos, por vezes constituindo granulomas, gerando doença cardíaca e/ou do trato gastrintestinal (principalmente doença esofágica e intestinal) crônicas. Nessa fase, estabelecidas as alterações cardíacas, o processo é irreversível e o prognóstico se torna mais reservado (DUMONTEIL, 1999).

Figura 5. Sinal de Romana



Fonte: http://www.investigalog.com/biologia_y_ciencias_de_la_salud/enfermedad-del-sueno-y-de-chagas-primera-parte/

1.6 O Diagnóstico da Infecção

O diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela clínica e confirmado quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial que oferece importantes subsídios, desde que realizado com técnicas apropriadas (MS/CNDST/AIDS e COSAH, 1998), reagentes adequados (SAÉZ-ALQUEZAR A.,1997).

1.6.1 O Diagnóstico Laboratorial

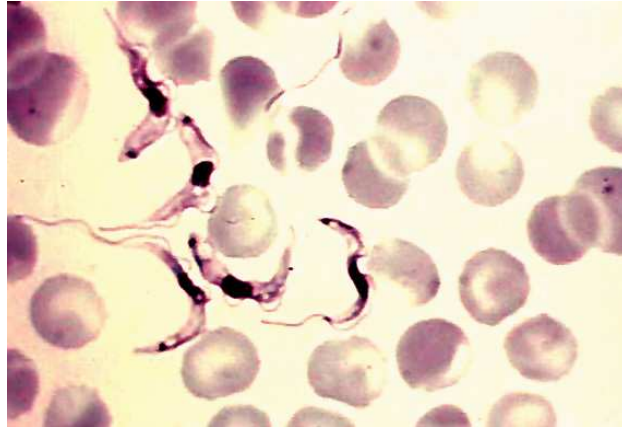
O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas pode ser realizado por meio da busca do parasito ou da resposta imune do hospedeiro infectado. Podem ser utilizados métodos parasitológicos e sorológicos de acordo com a fase da doença (REY, 2001)

1.6.2 Métodos Parasitológicos

Considerados padrão ouro os métodos parasitológicos podem ser utilizados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. Na fase aguda são utilizados métodos diretos e indiretos para pesquisa de tripanossomas na corrente sanguínea.

Os métodos diretos incluem a pesquisa de tripanossomas, onde o sangue fresco é examinado entre lâmina e lamínula, sendo positivo quando se encontra o parasito (geralmente em movimentação serpenteante entre as hemácias e leucócitos) com sua forma alongada, grande cinetoplasto e flagelo muito móvel (FIGURA 6a). Diante da suspeita clínica, se negativo o primeiro exame, deve-se repeti-lo por três ou quatro vezes ao dia durante vários dias (BRASIL, 2005).

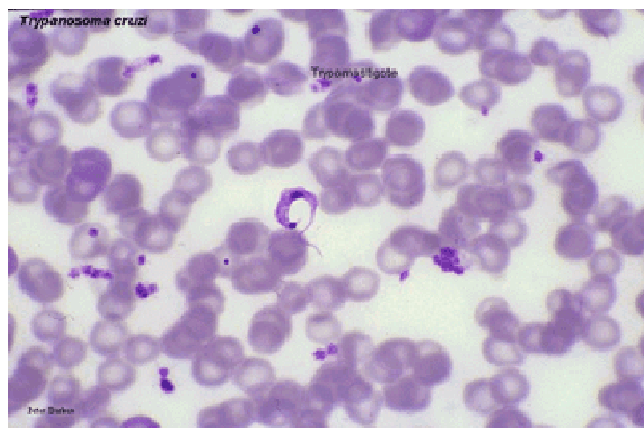
Figura 6a. Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* em sangue fresco



Fonte: <http://www.fernandosantiago.com.br>

Variáveis do método direto, como a coloração do Giemsa, gota espessa ou a concentração do sangue aumentam a probabilidade da detecção de baixas parasitemias (FIGURA 6b).

Figura 6b. Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* em sangue periférico corado pelo Giemsa.



Fonte: acessado o link - <http://www.labsaluti.com.br>

Os métodos parasitológicos indiretos incluem o xenodiagnóstico e a hemocultura. O xenodiagnóstico e a hemocultura em meio LIT (Liver Infusion Triptose) são incontestáveis quando o resultado é positivo, entretanto quando o

resultado é negativo, a possibilidade de infecção pelo *T.cruzi* não deve ser excluída.

O xenodiagnóstico é um dos exames parasitológicos aplicados à forma crônica, com registros de positividade na literatura entre 9% e 87,5% (LINDOSO, 2003).

O emprego rotineiro do xenodiagnóstico fica restrito a sua sensibilidade e há outras limitações inerentes a técnica tais como o longo período para liberação dos resultados (até 90 dias), a manutenção de ninfas e rejeição do paciente à aplicação repetida do exame ao natural (FIGURA 7).

Figura 7. Xenodiagnóstico



Fonte: acessado o link – <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/triatoma.htm>

A hemocultura alcança na forma crônica da doença até 94% de positividade (CHIARIE, LINDOSO, 1989, 2003), entretanto necessita de grande volume de sangue para manutenção da cultura sendo essa uma de suas desvantagens. A associação da hemocultura ao xenodiagnóstico, empregados repetidas vezes elevam a sensibilidade dessas técnicas.

Um outro método direto e rápido de fluorescência, o Quantitative Buffy Coat (QBC Method) que está sendo utilizado na pesquisa de plasmódios, tem sido aplicado com sucesso na pesquisa de tripanossomas, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo (FERREIRA, 2001).

Atualmente, a identificação morfológica dos parasitas por meio de observação visual tende a ser substituída por técnicas moleculares, a amplificação dos ácidos nucléicos do parasita pela Reação em Cadeia da Polimerase, (PCR).

Recentemente a PCR vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA do *T. cruzi*, alcançando até 100% no diagnóstico da forma crônica, permitindo revelar a presença do agente infeccioso mesmo quando presente no organismo em quantidades extremamente reduzidas (DIAZ, AVILA, 1992, 1993).

1.6.3- Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos constituem o alicerce no diagnóstico da doença de Chagas crônica devido a boa sensibilidade e especificidade, pois os níveis de anticorpos são demonstráveis décadas após a infecção (VATTUONE, 1973). A disponibilidade de tais procedimentos não só possibilita o reconhecimento etiológico, como também permite, entre outras utilidades, realizar inquérito epidemiológico controle de tratamento específico e triagem de doadores de sangue (AMATO NETO, 2005).

Na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia.

Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico e hemocultura) que podem ser utilizados apresentam baixa sensibilidade (LINDOSO, 2003). Sendo assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico.

Desde o começo do século XX, logo após a descoberta a doença de Chagas, o primeiro método sorológico ensaiado para o seu diagnóstico laboratorial foi a reação de fixação de complemento segundo Guerreiro & Machado introduzida em 1913, apresentando apenas valor histórico nos dias de hoje pela alta complexidade associada a baixos níveis de sensibilidade e especificidade (FERREIRA, 2001). Depois dela surgiram outras conhecidas como aglutinação em látex, floculação, hemaglutinação direta e indireta (SAÉZ-ALQUEZAR, 1997), imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1996) western blot (AMATO NETO, 2005) e ensaio imunoenzimático – ELISA (VOLLER, 1975), baseadas sempre na reação que se passa entre antígeno e anticorpo específico, variando apenas o mecanismo de evidenciá-la, com a técnica empregada. Estas técnicas permitem resultados em menor espaço de tempo e em alguns casos automação como, por exemplo, o Ensaio Imunoenzimático - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Além disso, permitem a análise de um grande número de amostras simultaneamente, ideal quando utilizadas na triagem de doadores em Unidades

Hemoterápicas e em inquéritos epidemiológicos. Testes que detectam antígenos ou anticorpos devem possuir alta sensibilidade e especificidade a fim de impedir a ocorrência resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente (BLEJER, 2001). Resultados falso-negativos acarretam risco sanitário, constituindo agravo à saúde. Resultados falso-positivos expressam prejuízo social ao doador (LUNARDELLI, 2007)

Quando se fala em diagnóstico sorológico, dois parâmetros importantes devem ser considerados: a sensibilidade e a especificidade do método.

De acordo com a legislação vigente no que diz respeito a triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia para doença de Chagas, é necessária a realização de um teste imunoenzimático de alta sensibilidade. (BRASIL, 2004).

A sensibilidade clínica ou diagnóstica é avaliada pela incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em questão (BRASIL, 2006).

A especificidade clínica ou diagnóstica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente não reagentes para a doença em questão (BRASIL, 2006)

O monitoramento efetivo dos conjuntos para diagnóstico de uso “in vitro”, para fins de registro e conseqüente comercialização do produto no país encontra-se regulamentado por força de legislação sanitária tornando obrigatória à avaliação de sua qualidade antes do mesmo ser disponibilizado no mercado (BRASIL, 1976, 2006). A diversidade dos conjuntos diagnósticos disponibilizados a cada ano no mercado nacional empregados na triagem e confirmação sorológica do *T.cruzi*, e sua variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade, justificam a importância do controle da qualidade desses produtos.

Garantir a qualidade do sangue, seus componentes e os insumos utilizados na sua qualificação vem sendo uma preocupação constante do setor terapêutico, principalmente quanto aos produtos relacionados ao sangue, seus componentes e os insumos utilizados na sua qualificação.

Um dos grandes desafios é a manutenção da confiabilidade da qualidade dos resultados, conquistada ao longo dos anos e conseqüentemente a garantia qualidade do sangue utilizado no país.

Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) vem analisando sistematicamente os conjuntos de diagnóstico de uso *in*

vitro da Classe III (reagentes, controles e calibradores, que apresentam alto risco ao usuário, ao paciente e/ou à saúde pública) em cumprimento a legislação vigente (BRASIL, 2006), através de análise prévia, fiscal e de controle, (BRASIL,1976,1977; INCQS, 2003) em atendimento a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS (ANVISA).

O painel constituído no presente trabalho terá por finalidade avaliar a sensibilidade e especificidade clínica conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* empregados na triagem e confirmação sorológica da doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

Diante do conjunto de dados que ilustram a importância do controle da qualidade de reagentes para a triagem e diagnóstico sorológico da doença de Chagas, nos pareceu justificável:

- Caracterizar unidades de plasma para composição de painel a ser empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos utilizados na triagem de doadores em Serviços de Hemoterapia e no diagnóstico laboratorial da doença de Chagas.
- Implementar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) do Departamento de Imunologia do INCQS, no controle da qualidade dos conjuntos de diagnóstico para a detecção de anticorpos anti *-T.cruzi*, em suas diferentes metodologias.
- Atender a demanda gerada pela Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso "in vitro" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (GEVIT/ANVISA/MS), Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) entre outros, no contexto das análises prévias, fiscais e de controle conforme preconizado na Lei nº 6360/77.

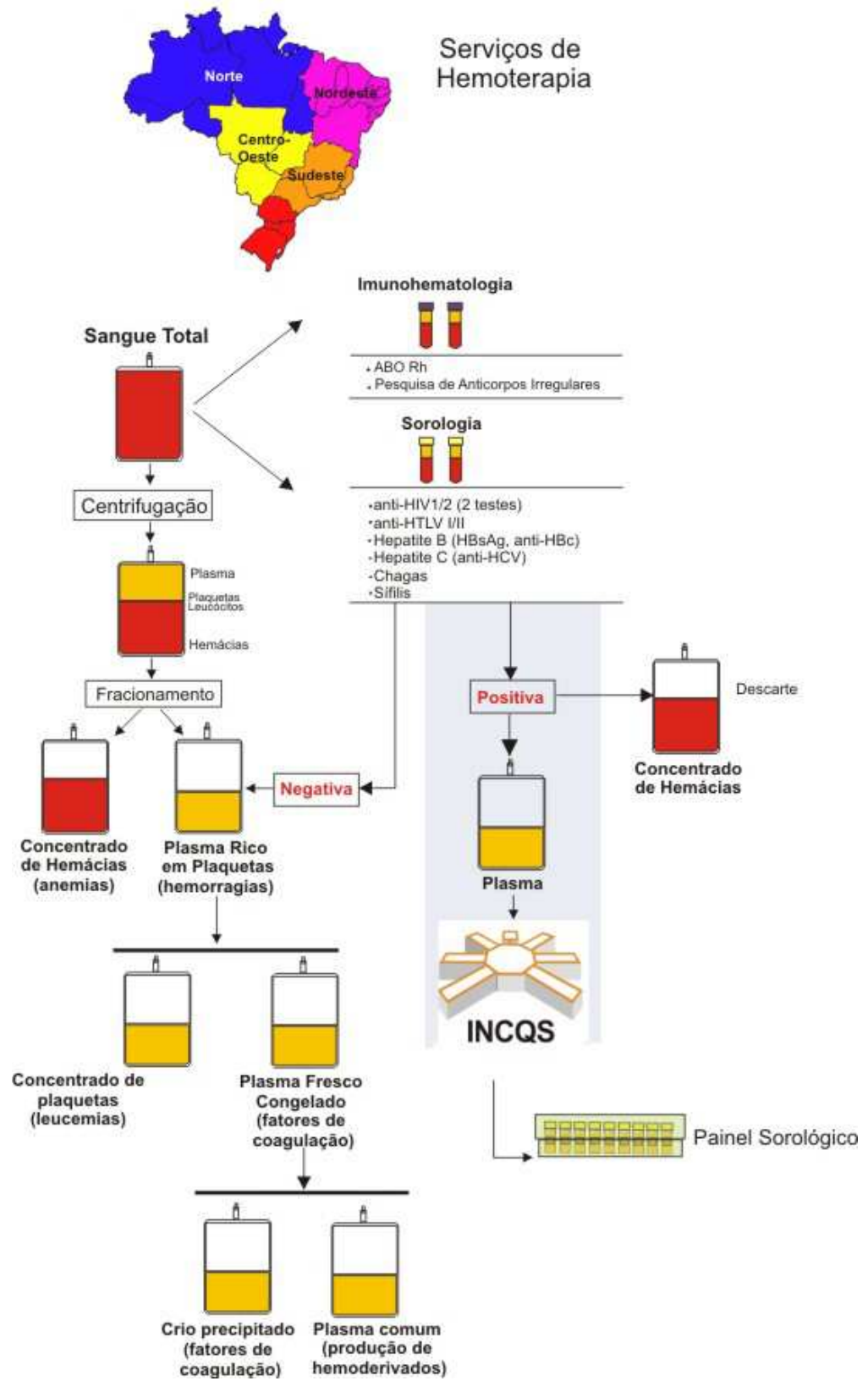
3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção de Unidades de Plasma

A confecção do painel para Chagas deu-se a partir da obtenção de unidades de plasma provenientes de Serviços de Hemoterapia das regiões Norte, Nordeste, Centro–Oeste e Sudeste do país.

Através de solicitação formal, no período de janeiro de 2001 a junho de 2006, os Serviços de Hemoterapia foram contatados para envio de unidades de plasma que após realização dos testes de triagem sorológica, preconizados pela RDC nº 153/04, apresentaram resultado reagente para um ou mais marcadores sorológicos (HIV1/2, HTLVII, HBc, HBsAg, HCV, Chagas e Sífilis). Estas unidades, consideradas impróprias para o uso terapêutico, segundo critérios estabelecidos na legislação supracitada, foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores, coletados em bolsas de coleta contendo anticoagulante CPDA – 1 (Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina) (FIGURA 8).

Figura 8 - Obtenção das unidades de plasma



3.2 Cadastro e Identificação das Unidades de Plasma

As unidades de plasma foram encaminhadas ao LSH/INCQS, acondicionadas em caixas de isopor (congeladas), acompanhadas de documentação pertinente, constando: nome da instituição, data da coleta, iniciais do doador, volume aproximado de plasma e resultados da sorologia, quando aplicável. No ato do recebimento, as unidades foram cadastradas em caderno ata de acordo com o preconizado no POP número 65.3420.013

Finalizado o cadastro, as unidades receberam identificação alfanumérica própria do LSH (FIGURA 9).

Figura 9 - Modelo utilizado no cadastro das unidades de plasma recebidas no LSH



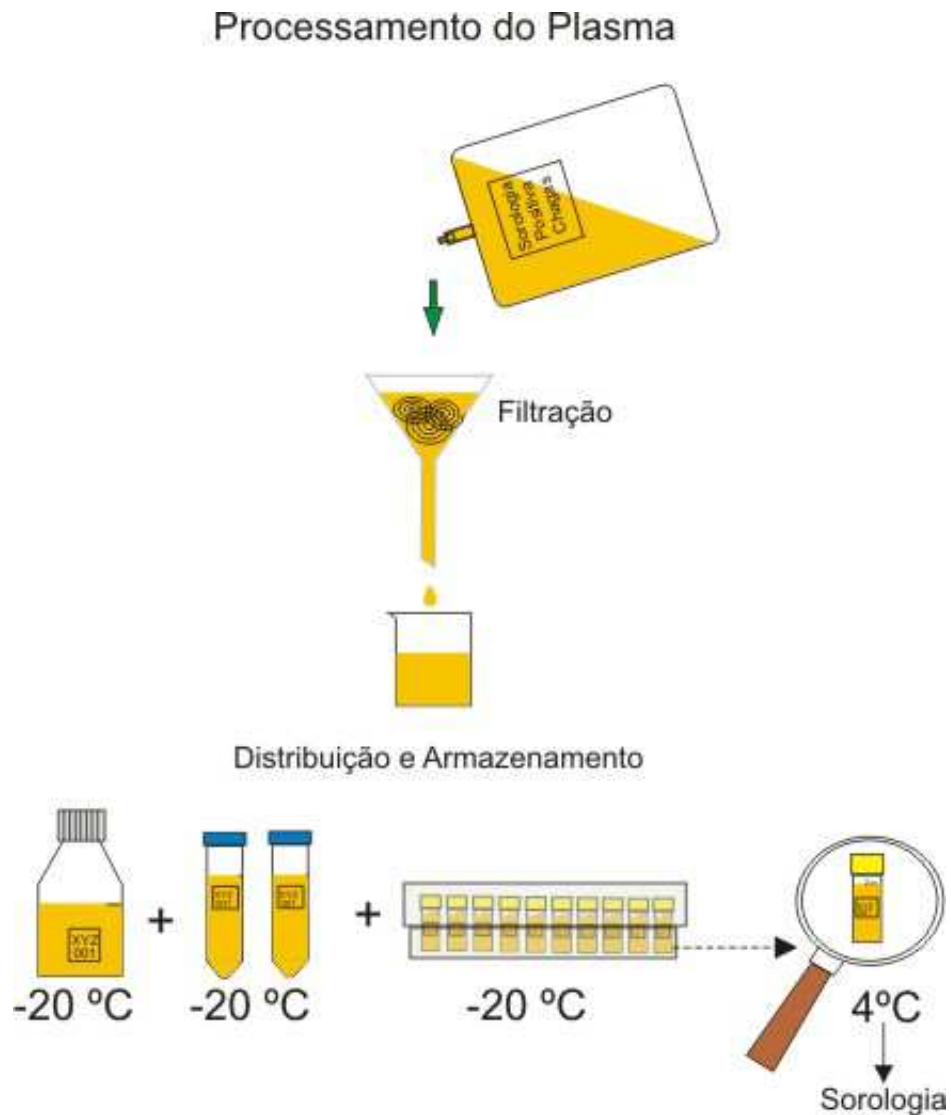
Fonte: LSH

3.3 Processamento das Unidades de Plasma

Somente as unidades de plasma íntegras ou com volume superior a 170 ml foram selecionadas para processamento. As unidades foram descongeladas a temperatura ambiente. Em cabine de fluxo laminar os plasmas foram filtrados, individualmente, em gaze hidrófila (09 fios/cm², 5 dobras – 8 camadas) para eliminação de fibrina.

As unidades de plasma fracionadas não receberam solução conservante. Após a filtração, cada unidade devidamente identificada e cadastrada, foi distribuída, acondicionada e estocada em garrafa Nalgene™ contendo 100,0 ml a -20°C; em 2 tubos Falcon™ contendo 40,0 ml estocados a -20°C e; 10 criotubos Nalgene™, com volume de 2,0 ml cada, estocados a temperatura a -20°C. No momento do uso, um criotubo era descongelado e estocado a 4°C (±2°C), sendo empregado na realização dos testes sorológicos para confecção do painel. (FIGURA 10).

Figura 10. Processamento, distribuição e armazenamento das unidades de plasma



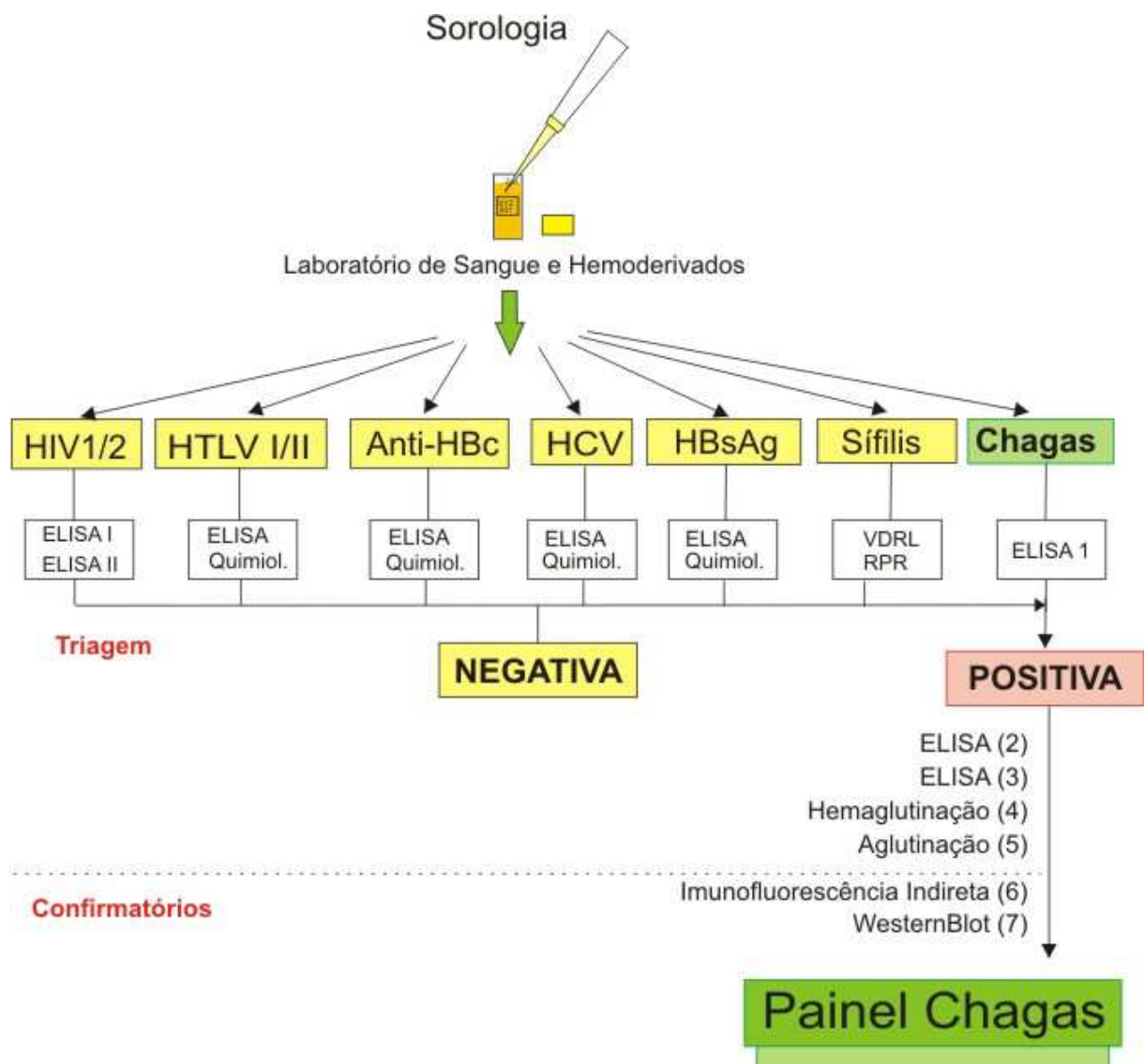
Fonte: LSH

3. 4 - Caracterização das unidades de plasma

Após o processamento e fracionamento dos plasmas foi realizada no LSH uma nova caracterização sorológica, seguindo-se rigorosamente a legislação vigente aplicável à triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia, RDC nº 153/04, anexo VIII, realizando-se os ensaios abaixo discriminados: (FIGURA 11)

- 02 (dois) testes sendo um deles imunoenzimático e o segundo teste por quimioluminescência ou por outra técnica com princípio metodológico ou antigênico distinto do primeiro teste para anti-HIV I/II.
- 01 (um) teste imunoenzimático ou quimioluminescência – para detecção de anticorpos anti-HTLV I/II, anti-HBc, anti-HCV, HBsAg e um teste imunoenzimático de alta sensibilidade para doença de Chagas denominado ELISA (1);
- 01 (um) teste treponêmico ou não treponêmico para Sífilis.

Figura 11 – Caracterização das unidades de plasma



As unidades de plasma reativas para doença de Chagas nos testes sorológicos, ELISA (1), foram avaliadas frente a dois outros ensaios imunoenzimáticos - ELISAs (2 e 3) - empregando diferentes antígenos daqueles utilizados na triagem inicial. Objetivando melhor caracterização do painel de Chagas realizamos ainda: 01 (um) teste de Hemaglutinação Indireta (4) e 01 (um) teste de Aglutinação (5). (QUADRO 1)

A presença de anticorpos anti-*T.cruzi*, foi confirmada pelas técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) (6) e Western blot (7); descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Conjuntos de diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do *T.cruzi*

Teste	Metodologia	Sensibilização (antígeno)
1	ELISA	Antígeno purificado <i>T.cruzi</i>
2	ELISA	Antígeno Recombinante /Proteína específica de Tripomastigota
3	ELISA	Antígeno <i>T.cruzi</i> específico Epimastigota
4	Hemaglutinação Indireta	Hemácias Sensibilizadas com Antígeno de <i>T.cruzi</i>
5	Aglutinação	Antígeno inativado do <i>T.cruzi</i>
6	Imunofluorescência Indireta	Suspensão Inativada de <i>T.cruzi</i>
7	Western Blot	Antígenos de secreção e excreção obtidos pelo cultivo de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

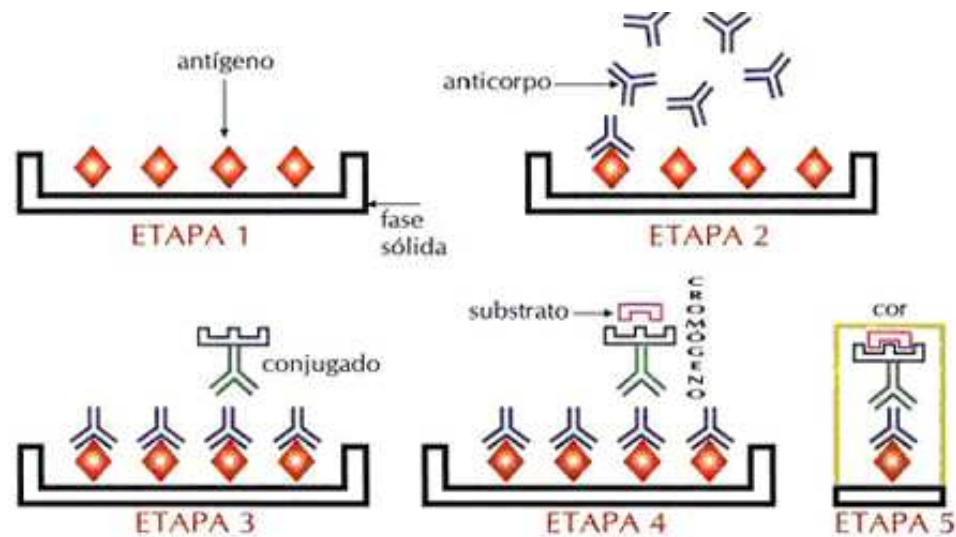
3.5 Testes Sorológicos Empregados na Caracterização do Painel

Os testes realizados seguiram rigorosamente as instruções de uso dos fabricantes dos conjuntos de diagnósticos utilizados na caracterização dos plasmas. Todos os conjuntos de diagnóstico empregados nas análises possuíam registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA/MS.

3.5.1 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste ELISA possui como princípio básico a imobilização de reagentes (antígenos ou anticorpos) em uma fase sólida (microplaca), enquanto o outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática quanto da atividade imunológica do anticorpo. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos e anticorpos. O método indireto tem sido amplamente empregado na detecção de anticorpos. Neste caso, microplacas são sensibilizadas com antígenos que após bloqueio reage com anticorpos da amostra. O conjugado anti-imunoglobulina humana, reage com o anticorpo capturado pelo antígeno e a reação é revelada com a solução cromógena. A reação é interrompida por uma solução ácida e a intensidade de cor verificada através de leitora de microplacas (fotocolorimétrica). Além das amostras a serem avaliadas, são adicionados as microplacas os soro controle positivos e negativos, utilizados na validação e cálculo do ponto de corte do ensaio (cut-off).

Fig.12 – Representação Esquemática do teste de ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos.



Fonte: <http://biomedicinabrasil.blogspot.com>

A interpretação dos Ensaio Imunoenzimáticos, empregados na caracterização das unidades de plasma para os diferentes marcadores sorológicos, foi realizada seguindo-se rigorosamente os critérios estabelecidos pelos fabricantes, para validação dos ensaios e cálculo do ponto de corte (cut-off).

Para homogeneização de resultados obtidos nos diferentes ensaios imunoenzimáticos, a positividade foi determinada pela razão dos valores de densidade ótica (D.O.) entre os plasmas avaliados e o “cut-off” calculado de acordo com as especificações estabelecidas pelo fabricante de cada conjunto diagnóstico utilizado, denominado de rácio.

$$\frac{\text{D.O. do plasma teste}}{\text{“Cut-off” (ponto de corte)}} = \text{Rácio}$$

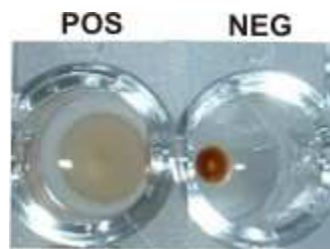
As unidades de plasma que apresentaram valores de Rácio superiores ou iguais a 1,0 foram consideradas positivas e valores inferiores a 1,0 consideradas negativas.

3.5.2 - Teste de Hemaglutinação Indireta

A hemaglutinação indireta baseia-se na propriedade que têm os anticorpos de produzir aglutinação específica na presença de glóbulos vermelhos sensibilizados com antígenos citoplasmáticos e de membrana do *Trypanosoma cruzi*.

Os testes de Hemaglutinação utilizados na detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* foram interpretados como reagentes quando apresentavam aglutinação completa das hemácias com formação de manto homogêneo ou não reagentes quando as hemácias sedimentavam-se em forma de botão, segundo instruções do fabricante do produto (FIGURA 13).

Figura 13 - Reação de hemaglutinação indireta



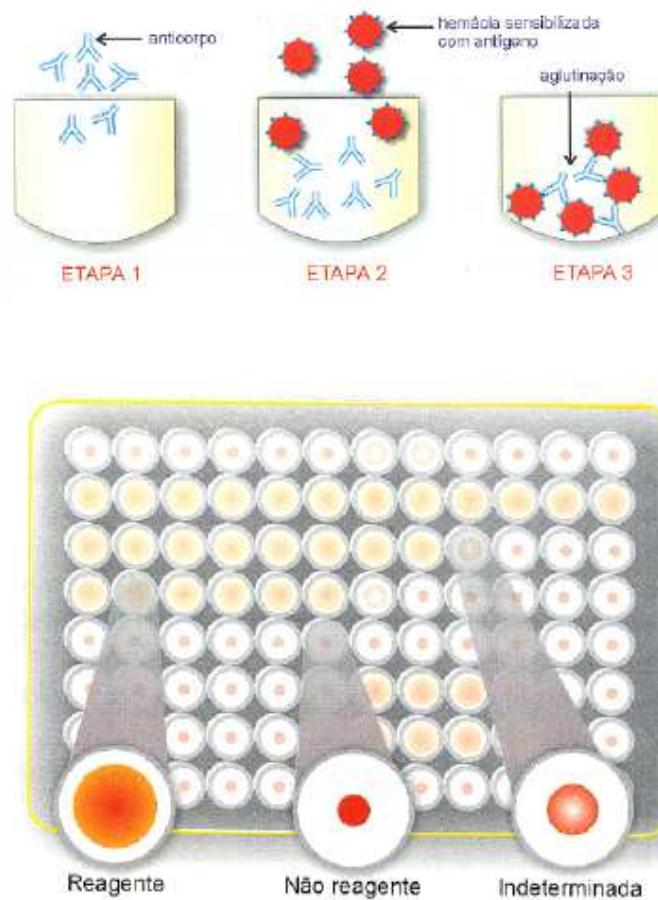
Fonte: <http://www.fio.edu.br>

3.5.3 - Teste de Aglutinação Indireta

O teste de aglutinação indireta, caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis (partículas de gelatina) que contém determinantes antigênicos em sua superfície.

Os ensaios de aglutinação apresentaram resultados reagentes quando partículas de gelatina formaram um grande anel com margem exterior multiuniforme e áspera, ocorrendo aglutinação periférica ou ainda quando apresentaram partículas firmemente aglutinadas cobrindo o fundo do poço uniformemente. Quando as partículas concentravam-se em formato de botão no centro do poço com margem externa redonda e lisa a reação foi considerada negativa, segundo as instruções do fabricante do produto. (FIGURA 14)

Figura 14 - Teste de Aglutinação Indireta



Fonte: <http://dc197.4shared.com/doc/HoIB4iCb/preview.html>

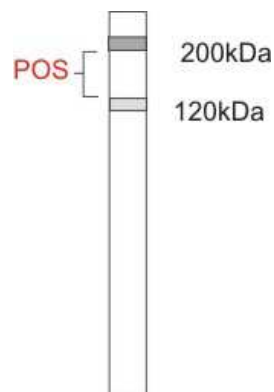
3.5.4 - Western Blot (WB)

O teste de Western Blot; consiste na detecção de anticorpos específicos dirigidos a proteínas do antígeno do parasita, previamente separadas imunoeletroforéticamente de acordo com sua massa molecular e transferidas para membrana de nitrocelulose que são posteriormente cortadas em tiras de aproximadamente 5 mm. Essas tiras prontas para uso são acondicionadas em canaletas, onde são acrescentados soro humano diluído que após incubação e lavagens com solução apropriada e adição subsequente de conjugado anti-IgG, humano e lavagem, é adicionada solução cromógena. Após a retirada e lavagem da solução cromógena, com o auxílio de pinça plástica, e secagem completa ao ar livre em papel de filtro, efetua-se a leitura das tiras.

Para interpretação do WB utilizamos os critérios estabelecidos pelo fabricante do produto. A positividade do teste foi verificada visualmente pela presença de bandas de

proteínas do antígeno do *T.cruzi* na região de 200 a 120 kDa e comparadas com fita padrão positiva fornecida no kit. As amostras foram consideradas negativas quando apresentavam ausência de bandas na região de 200 a 120 kDa (FIGURA 15).

Figura 15 – Representação da tira de western blot com a presença de banda nas regiões de 200 e 120 kDa.



Fonte:LSH

3.5.5 - Imunofluorescência Indireta (IFI)

O ensaio de Imunofluorescência Indireta consiste na reação de soros ou de plasmas humanos, com parasitas (*T.cruzi*) fixados em lâminas de microscopia empregadas na reação de fluorescência. A reação entre o antígeno fixado na lâmina e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina humana (Ig) conjugada ao Isoticianato de Fluoresceína. A visualização da reação é realizada através da leitura da lâmina em microscópio de fluorescência.

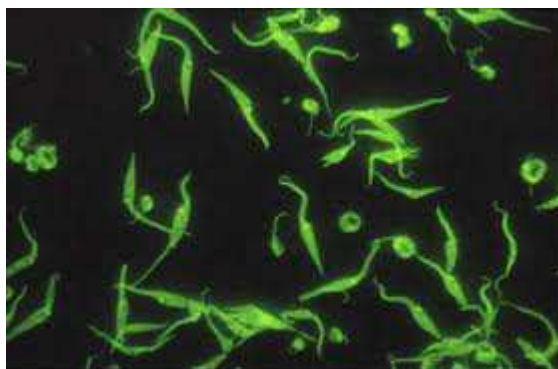
Figura 16 – Representação Esquemática do Teste de Imunofluorescência



Fonte: www.biomanguinhos.fiocruz.br

A interpretação dos resultados da IFI foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante. As unidades de plasma foram classificadas como positivas quando o *T. cruzi* apresentou fluorescência amarela esverdeada em todo seu contorno. Amostras de plasma com ausência de fluorescência foram consideradas negativas. (FIGURA 17).

Figura 17 - Reação de Imunofluorescência



POS



NEG

Fonte: <http://www.labsaluti.com.br>

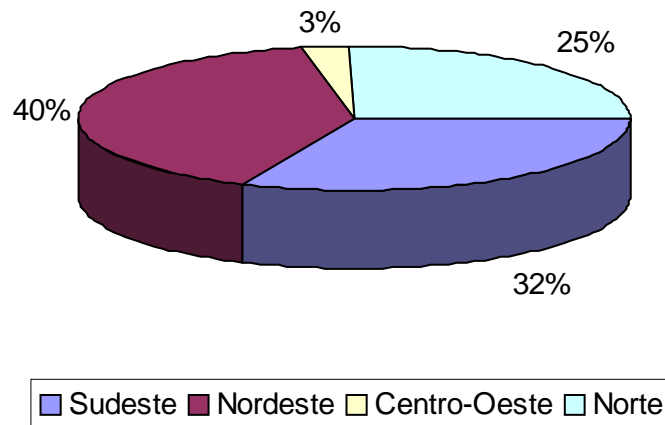
RESULTADOS

4.1 – Das Unidades de Plasma Recebidas

4.1.2 – Quanto à procedência

Foram encaminhadas para análise no Laboratório de Sangue e Hemoderivados, no período de janeiro 2001 a junho de 2006, um total de 2298 unidades de plasma de diferentes regiões do país. Das 2298 unidades encaminhadas 40% (n=926) eram provenientes da região Nordeste, 32 % (n=726) da região Sudeste, 25% (n= 582) da região Norte e 3% (n=64) da região Centro-Oeste (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Distribuição das unidades de plasma de acordo com a procedência.



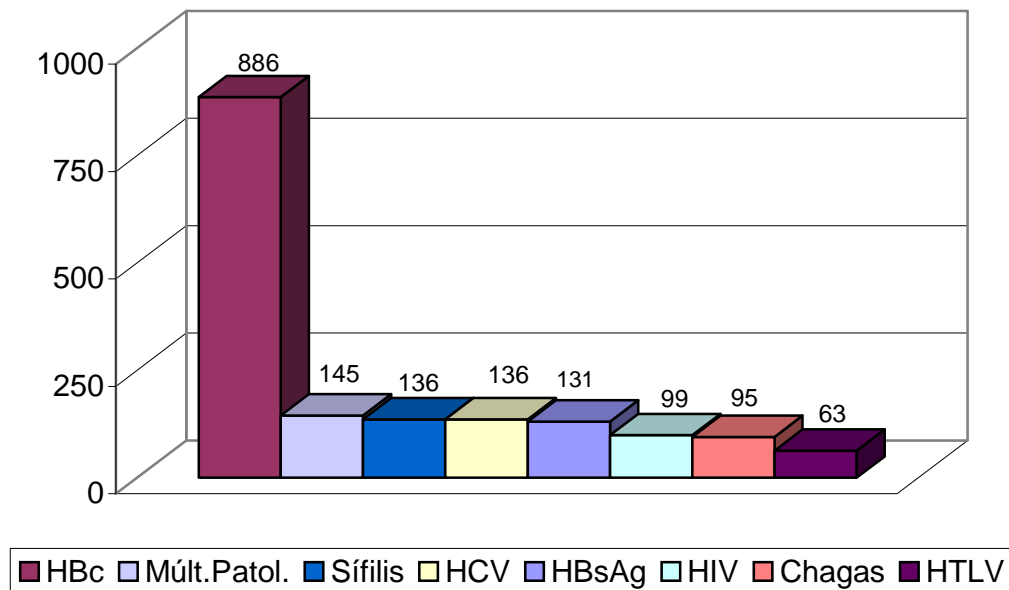
Fonte: LSH, 2008

4.1.3 – Quanto à sorologia realizada no Serviço de Hemoterapia de origem.

Das 2298 unidades de plasma recebidas, 886 (38,5%) foram reativas para anti-HBc, 145 (6,3%) positivas para mais de um marcador sorológico, 136 (6,0%) para anti-HCV, 136 (6,0%) reativas para Sífilis, 131 (5,7%) reativas para HBsAg, 99 (4,3%) reativas para anti-HIV, 95 (4,1%) apresentavam sorologia reativa na origem para doença de Chagas, 63 (2,7%) reativas para anti-HTLV-I/II.

Não constava na rotulagem de 607 (26,4%) unidades de plasma a reatividade pela qual foi excluída e encaminhada ao INCQS. (GRÁFICO 2).

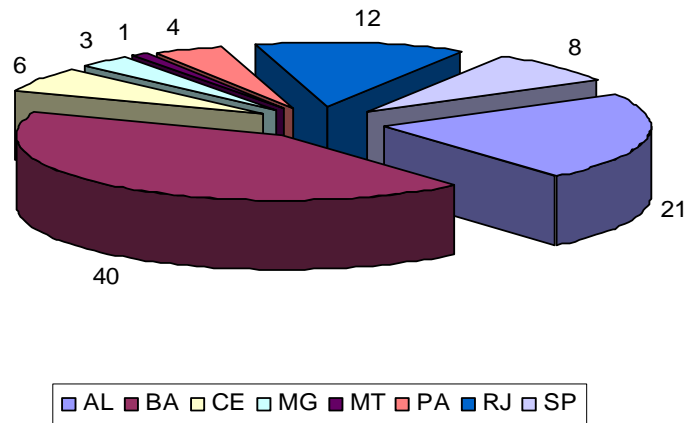
Gráfico 2 - Distribuição das unidades de plasma recebidas de acordo com a sorologia na origem.



Fonte: LSH, 2008

No gráfico 3 estão distribuídas por estados da federação as unidades de plasma reativas para doença de Chagas encaminhadas ao INCQS pelos diferentes Serviços de Hemoterapia.

Gráfico 3 - Distribuição pelos estados de origem das unidades de plasma com sorologia reagentes para doença de Chagas descrita na rotulagem encaminhada ao INCQS.

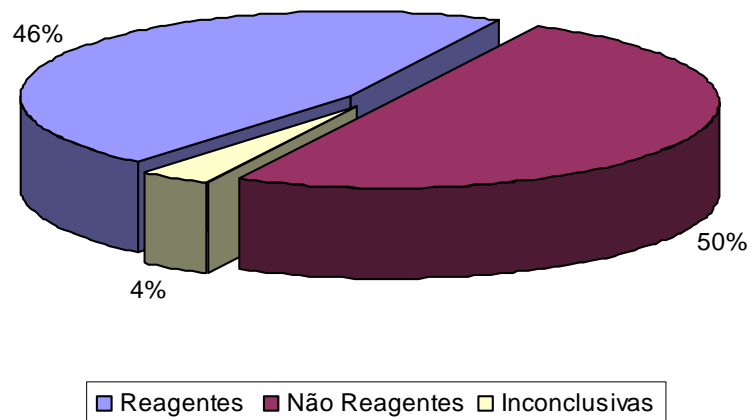


Fonte: LSH, 2008

4.2 – Dos resultados sorológicos obtidos

Após descongelamento e filtragem individual das 95 unidades de plasma encaminhadas, foram selecionadas 84 unidades de plasma viáveis (volume final superior a 170 ml). Destas 39 (46,4%) apresentaram resultados reagentes, 42 (50%) amostras foram não reagentes, 3 (3,6%) apresentaram resultados inconclusivos nos ensaios realizados. (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 - Resultado da sorologia das unidades de plasma nos ensaios realizados



Fonte: LSH, 2008

Desta forma, seguiram para melhor caracterização, confirmação e seleção para composição do painel, 39 unidades de plasma reativas para doença de Chagas seguindo-se o fluxo de ensaios descrito na FIGURA 18.

Figura 18 - Fluxo de testagem das amostras para composição do painel.

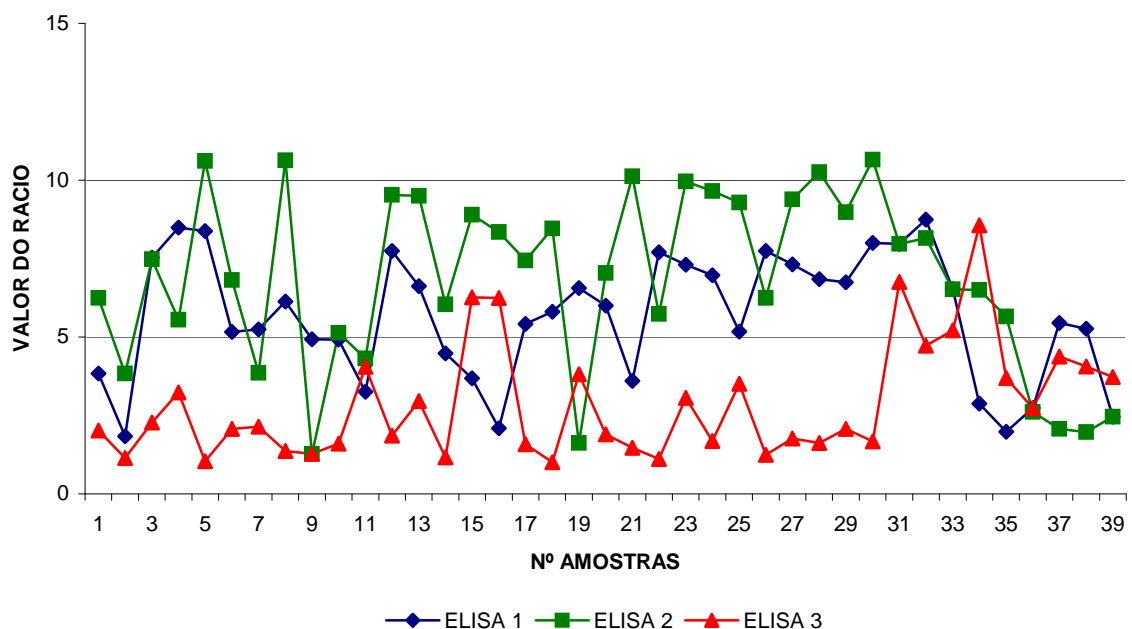


Fonte: LSH, 2008

4.2.1 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISAs)

No Gráfico 5 estão representadas os valores de ratio obtidos nos ensaios imunoenzimáticos anti -*T. cruzi* – ELISA (1,2 e 3) realizados.

Gráfico 5 - Valores de ratio obtidos nos ensaios imunoenzimáticos (1, 2 e 3)



Os valores de rácio das amostras nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA 1, 2 e 3) variaram de 1,1 a 10,6. O perfil apresentado demonstrou que as amostras analisadas são de baixa e média reatividade.

4.2.2 Testes de Hemaglutinação Indireta e Aglutinação

Realizamos ensaios qualitativos de aglutinação e hemaglutinação indireta em 30 (76,9%) das 39 amostras reagentes nos ensaios imunoenzimáticos (1, 2 e 3). Todas as 30 amostras (100%) foram positivas nos testes de Hemaglutinação Indireta e de Aglutinação, utilizados na avaliação das mesmas.

4.2.3 Testes Confirmatórios

Cem por cento (100%) das amostras de plasma selecionadas foram reagentes na técnica de imunofluorescência indireta. Em 30 (76,9%) das 39 amostras confirmadas positivas para pela técnica de IFI empregamos a técnica de Western blot.

A positividade das amostras foi confirmada em 29 (96,7%) das 30 amostras analisadas pela presença de bandas na região entre 200 e 120 kDa de acordo com os critérios de positividade determinados pelo fabricante do conjunto diagnóstico utilizado. Uma amostra (3,33%) apresentou resultado falso negativo.

Os resultados dos ensaios sorológicos de triagem, Imunoenzimáticos (ELISAs 1, 2 e 3) Hemaglutinação, Aglutinação, e confirmatórios Imunofluorescência Indireta e Western Blot são sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Sumário dos resultados da caracterização sorológica das unidades de plasma

Amostra	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3	Hemaglutinação	Aglutinação	WB	IFI
1	3,84	6,24	2,02	POS	POS	POS	2+
2	1,84	3,84	1,14	POS	POS	POS	1+
3	7,53	7,48	2,28	POS	POS	POS	1+
4	8,49	5,55	3,23	POS	POS	POS	2+
5	8,38	10,61	1,04	POS	POS	POS	1+
6	5,16	6,82	2,07	POS	POS	POS	1+
7	5,25	3,86	2,14	POS	POS	POS	1+
8	6,13	10,63	1,37	POS	POS	POS	2+
9	4,93	1,28	1,28	POS	POS	POS	2+
10	4,92	5,13	1,6	POS	POS	NEG	1+
11	3,26	4,32	4,05	POS	POS	POS	1+
12	7,75	9,53	1,86	POS	POS	POS	1+
13	6,62	9,5	2,96	POS	POS	POS	1+
14	4,48	6,04	1,16	POS	POS	POS	1+
15	3,68	8,9	6,27	POS	POS	POS	1+
16	2,09	8,35	6,25	POS	POS	POS	2+
17	5,42	7,44	1,58	POS	POS	POS	1+
18	5,81	8,46	1,01	POS	POS	POS	1+
19	6,56	1,62	3,82	POS	POS	POS	1+
20	6,00	7,04	1,9	POS	POS	POS	1+
21	3,6	10,12	1,47	POS	POS	POS	2+
22	7,7	5,73	1,11	POS	POS	POS	2+
23	7,31	9,96	3,06	POS	POS	POS	2+
24	6,97	9,65	1,68	POS	POS	POS	2+
25	5,17	9,29	3,51	POS	POS	POS	1+
26	7,74	6,25	1,24	POS	POS	POS	2+
27	7,32	9,39	1,77	POS	POS	POS	3+
28	6,85	10,26	1,62	POS	POS	POS	1+
29	6,74	8,98	2,07	POS	POS	POS	1+
30	8,00	10,65	1,67	POS	POS	POS	2+
31	7,97	7,97	6,76	x	x	x	4+
32	8,75	8,15	4,72	x	x	x	3+
33	6,53	6,52	5,21	x	x	x	3+
34	2,88	6,5	8,56	x	x	x	2+
35	1,98	5,65	3,69	x	x	x	1+
36	2,73	2,61	2,73	x	x	x	4+
37	5,45	2,07	4,38	x	x	x	4+
38	5,27	1,97	4,06	x	x	x	4+
39	2,46	2,46	3,72	x	x	x	1+

5 DISCUSSÃO

A triagem sorológica de doadores para Doença de Chagas de acordo com a legislação vigente é realizada pela detecção de anticorpos no soro ou plasma humano empregando-se testes de alta sensibilidade (BRASIL, 2006; BLEJER, 2001) e especificidade.

A possibilidade de um resultado falso negativo, tanto em laboratórios clínicos quanto em Serviços de Hemoterapia, representa um sério risco sanitário assim como falsos resultados positivos podem ter sérias implicações pelos problemas pessoais e sociais que podem causar ao doador (LUNARDELLI, 2007). Levando-se em consideração o número de conjuntos disponibilizados a cada ano no mercado nacional e a importância da manutenção da qualidade dos mesmos, torna-se necessária à manutenção efetiva do controle da qualidade destes produtos antes de sua liberação para o mercado nacional (BRASIL, 1976).

Objetivando a implementação do painel de Chagas empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos, unidades de plasma de indivíduos de perfis sorológicos diferenciados, foram encaminhadas solicitações para Serviços de Hemoterapia de diferentes regiões do país no período de janeiro de 2001 a junho de 2006. Excetuando-se os estados da região Sul, que por motivos inerentes a nossa vontade não atenderam a solicitação de envio de unidades de plasma no período em estudo, as demais regiões e em maior percentual a região Sudeste e Nordeste, encaminharam na totalidade 95 amostras para composição do painel. Destacando-se os estados da Bahia, Alagoas, Rio de Janeiro e São Paulo respectivamente.

Atualmente, grande parte dos Serviços de Hemoterapia no Brasil dispõe de sistema informatizado que disponibiliza etiquetas para identificação da reatividade da unidade de plasma que levou ao bloqueio e conseqüente motivo do descarte. (BRASIL, 2004). Entretanto, do total das 2298 unidades de plasma encaminhadas ao INCQS, 607(26,4%) não identificavam a sorologia em sua rotulagem. Segundo a legislação vigente, não é obrigatória, a identificação do motivo do descarte na rotulagem das unidades, uma vez que nos registros internos do Serviço de Hemoterapia e/ou sistema informatizado, constam o real motivo do descarte das unidades encaminhadas.

Das 95 unidades de plasma caracterizadas na sua origem como reagentes para doença de Chagas, foram selecionadas das 84 viáveis, 39 (46,4%) unidades

verdadeiramente positivas para doença de Chagas. As referidas amostras apresentaram resultados reagentes nos 3 ensaios imunoenzimáticos que empregaram: antígenos purificados (Elisa 1), recombinantes /proteína específica de tripomastigota do *T.cruzi* (Elisa 2) e específico de epimastigota (Elisa 3). As unidades de plasma selecionadas para composição do painel de Chagas apresentaram valores de rácio que variaram de 1.1 a 10.6 nos testes imunoenzimáticos, ou seja, na quase totalidade de baixa e média reatividade por incluírem apenas amostras de doadores de sangue. Faz-se necessária a inclusão de amostras de alta reatividade, uma etapa a ser realizada para complementação do referido painel.

Um total de 42 amostras (50%) apresentou resultados não reagentes e 3 amostras foram inconclusivas. As unidades de plasma com sorologia reagente nos Serviços de Hemoterapia de origem, quando testadas no LSH, que apresentaram resultados contraditórios, ou seja, negativos, não apontam para erro durante a triagem sorológica do Serviço de Hemoterapia. De acordo com a legislação vigente, não é obrigatória a realização de testes confirmatórios nestes Serviços. Neste caso cabe apenas a repetição do teste de triagem e em caso de positividade o doador é encaminhado para um Laboratório de Referência (LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública) para realização do teste confirmatório (BRASIL, 2004).

Foram avaliadas qualitativamente nas técnicas de aglutinação e hemaglutinação, 30 das 39 amostras reagentes nos Ensaio Imunoenzimáticos, apresentando 100% de concordância.

Todas as amostras foram avaliadas pela técnica de imunofluorescência confirmando como reagentes 39 (46,4%) das 84 viáveis.

Das 30 unidades de plasma avaliadas pela técnica de western blot, apenas uma (3,33%) apresentou resultado falso negativo. Amato Neto e colaboradores, em 2005 comparando a técnica de western blot às técnicas de hemaglutinação, IFI e ELISA obteve 100% de sensibilidade em um grupo de 30 amostras verdadeiramente positivas no ELISA que empregava antígenos de formas epimastigotas e ensaio de hemaglutinação para doença de Chagas, com amostras de valores de rácio superiores a 9,0. A amostra em questão apresentou rácio de 1,6 no ELISA 3, ensaio de sensibilização antigênica semelhante ao utilizado pelo autor, o que explicaria o resultado falso negativo obtido.

Não foram apresentados resultados de 9 amostras nas técnicas de Western Blot, Aglutinação e Hemaglutinação. No que diz respeito ao Western Blot o produto foi descontinuado pela empresa por razões desconhecidas e por isso não testamos todas as amostras, não havendo até a presente data similar no mercado nacional. Quanto aos ensaios de aglutinação e hemaglutinação não foram realizados, serão complementados em uma etapa posterior de nosso trabalho uma vez que não dispúnhamos de quantitativos suficientes de conjuntos diagnósticos no período em questão.

É fato que a transmissão natural da doença de Chagas no país foi reduzida e que refletirá na diminuição em médio prazo de doadores e conseqüentemente a redução transfusional e que há tecnologia bastante para sustentar os níveis de controle alcançados. Em particular, o Brasil e outros países do Cone Sul estão comemorando a eliminação do *Triatoma infestans* em vastas regiões, o que representou enorme avanço nos índices de incidência e de impacto da doença humana (DIAS, 2006).

Hoje os riscos de doença de Chagas adquirida por transfusão sangüínea no Brasil são mínimos, tendo sido estimados entre 3 a 20 casos em mais de 4 milhões de transfusões anuais (DIAS, 2006).

Caberá aos técnicos e políticos a tarefa de manutenção das conquistas, no sentido da manutenção da vigilância epidemiológica, e da qualidade dos produtos e insumos utilizados na qualificação do sangue e seus derivados utilizados no país.

6 CONCLUSÃO

As 39 amostras de plasma caracterizadas neste trabalho constituem uma ferramenta de uso potencial na ampliação da capacidade analítica do LSH no controle de qualidade dos conjuntos para triagem e diagnóstico da doença de Chagas, em atendimento a legislação brasileira no que diz respeito às solicitações de análise prévia, fiscal, controle ou ainda análises de orientação. Estes conjuntos são utilizados em dois momentos distintos: em laboratórios clínicos como apoio ao diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* e em Serviços de Hemoterapia na triagem sorológica dos doadores de sangue.

7 PERSPECTIVAS

Empregar o painel confeccionado como ferramenta para avaliar a qualidade dos conjuntos diagnósticos utilizados no mercado nacional, no diagnóstico laboratorial e triagem sorológica da doença de Chagas de doadores em Serviços de Hemoterapia.

REFERÊNCIAS

AMATO NV; MARCHI, CRD; FERREIRA, CS; FERREIRA, AW . Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 534-535, 2005

ARAGÃO, M.B. “Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia”. **Rev. Saúde Públ.** (São Paulo); 22:401-410. 1983.

ARRIETA R, DAQUINO B, ROSSO N, FERRERAS MG, JUAREZ N. Evaluación de una metodología de temizaje em la enfermedad de Chagas em San Luís, Argentina. **Salud Pública de México**; 46(5):430-437. 2004

ÁVILA HA, PEREIRA JB, THIERMANN O, PAIVA E, DEGRAVE W., MOREL CM, SIMPSON L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparasion with serology and xenodiagnosis . **J. Clin. Microbiol.**, 31:2421-2426,1993.

BECERRIL NH, MEJIA AM, VERDUGO, MAB, MURILLO VG, TOQUERO, EM, LÓPEZ R, TREVEVETHAN S, CARDENAS M, REYES PA, HIRAYAMA K, MONTEON VM. Blood Transfusion and iatrogenic risks in México city. Anti-*Trypanosoma-cruzi* seroprevalence in 43048 blood donors, evaluation of parasitemia, and eletrocardiogram findings in seropositive. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 100(2):111-116, 2005.

BLEJER, JL, SAGUIER MC, SALAMONE HJ, Antibodies to *Tripanosoma cruzi* among blood donorsin Buenos Aires Argentina. **Int.J. Infect Dis** 5 89:-93, 2001

BRASIL. Lei nº6360 de 23 de setembro de 1976. Disp õe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos saneantes e outros produtos, e dá outras providências. [on line] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em:2 jun. 2008.

BRASIL. Decreto nº 79094 de 5 de janeiro de 1977. R egulamenta a Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos produtos de higiene, saneantes e outros produtos. [on line] Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 02 jun. 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 153 de 14 de junho de 2004 . Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, a placenta e da medula óssea. [on line] Disponível em: www.anvisa.gov.br/sangue/legis/leis.htm. Acesso em: 02 jun. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 6ª edição, Brasília, DF, , 282- 296 , 816p, 2005^a

BRASIL. Resolução RDC nº 206 de 17 de novembro de 2006. Estabelece Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso "In Vitro" e seu Registro, Cadastramento e suas Alterações, Revalidações e Cancelamento. [on line] Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em: 30 jun. 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portal Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Casos da Doença no Brasil, 2007 [on line] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualisar_texto.cfm?idtxt=27875, acesso em 18/06/2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica Doença de Chagas Aguda por transmissão oral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2007 [on line] Disponível em [:www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf](http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2308.pdf). Acesso em: 08.abr.2008

CAMARGO ME. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 8: 227-234.1996.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; 1: 159-218. 1909.

CHAGAS CRJ. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um trypanozoma, *Trypanosoma cruzi*: Nota prévia. **Brazil-Medico** 23(16):161. 1909^a

CHIARIE, DIAS JCP, LANA M. CHIAR CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas` disease **Rev Soc. Bras. Med Trop.** 22: 19-23, 1989.

COURA JR, Tripanosomose, Doença de Chagas, **Cienc. Cult.** Vol.55 vol nº1 São Paulo. Jan./Mar 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA JR. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop** 39 (Supl. IV): 113-117,2006

DANTAS AP, OLIVIERI BP, GOMES FHM, CASTRO SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with própolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethno-Pharmacology**.103: 187-193, 2006.

DIAS JPC. O controle da doença de Chagas no Brasil. In Silveira AC(org) El control de la enfermedad de Chagas em los países del Cono Sur de América : historia de uma iniciativa internacional 1991/2001.OPS, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro , 145-205, 2002

DIAS JCP, MACEDO VO. Doença de Chagas. In: Coura JR, organizador. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**; . p. 557- 2005

DIAS JCP, Chagas Disease :successes and Challenges. **Cad. Saúde Pública do Rio de Janeiro**, 22(10):2020-2021, out, 2006.

DIAS JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. De Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 1:513-522, 2007.

DIAZ C, NUSSENZWEIG V., GONZALES A, An Improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**;46:616-23, 1992

DUMONTEIL E. Update on Chagas' disease in México. **Salud Pública de México**; 41(4):322-327,1999.

DUTRA WO, ROCHA MOC, TEIXEIRA MM, The Clinical Immunology of Human Chagas Disease TRENDS ins **Parasitology** 2005;21(12)581-587, 2005.

FERREIRA AW, ÁVILA SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: **Guabanara Koogan**, 2^a ed, p. 241-254, 2001.

FERREIRA ILM, SILVA TPT. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(5): 507-509, set-out-2006.

FLUXO de Análises Prévia, Fiscal, Controle e outras Realizadas no Laboratório de Sangue e Hemoderivados. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3420.021), 4p. 2003

FORATTINI, O.P. "Biogeografia, origem e distribuição de triatomíneos no Brasil". **Rev Saúde Públ** (São Paulo); 14:265-299.1980.

LINDOSO, P B A A & SHIKANAI-YASUDA MA, Doença de Chagas crônica do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase.**Rev. Saúde Pública** 37(1):107-115, 2003:

LORENZO, MG, LAZZARI CR. Temperature and relative humidity affect the selection of sheltersby *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. **Acta Tropica**; 72:72:241-242, 1999.

LUNARDELLI A, BORGES FP, MELLO FK, & ZEFERINO, AAS. **RBAC** 39 (2):139-141, 2007.

MAZZA, S, La Enfermedad de Chagas en la República Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.47:273-302, 1949

MINISTÉRIO DA SAÚDE CNDST DST/AIDS E COSAH. TELELAB N.11.**Doença de Chagas**–Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública Brasília: Manual. 75p. 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Cadastro, Distribuição e Armazenamento de Plasma para confecção de painéis sorológicos. In: **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção, 65.3420.013 - 4p.

REY L., **Parasitologia**. 3ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001. 856 p.

SAÉZ-ALQUEZAR A., LUQUETTI, A.O., PEREIRA, J.B., MOREIRA E.F., GADELHA, MSF, GARCIA-ZAPATA M.T., ARRUDA, A.H. Estudo Multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos de diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico da infecção pelo *Trypanossoma cruzi*. **Rev. Pat. Trop.** 26: 343-374,1997.

SANCHES, M.L. et al. Mejoria continua de la calidad – **Guia para los laboratorios clinicos de America Latina**. Editora Médica Panamericana, 1995.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**; 38 Suppl 3:7-, 2005

SILVEIRA A.C. & VINHARES M. Grupo de trabalho em Doença de Chagas, FUNASA **Ministério da Saúde** , 2000.

SILVEIRA A.C. et al.. El control de la enfermedad de Chagas em los Países del Cono Sur de América. Uberaba, **OPAS** / Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 316p., 2002.

VATTUONE NH, SZARFMAN A., GONZALEZ CAPPA SM Antibody response and Immunoglobuline levels in human with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas`disease). **J. Trop. Med. Hyg**; 76:45-7, 1973

VOLLER A, DRAPER, C, BIDWELL, D E, BARTLETTA A. A micro-plate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease **Lancet**, 1:426-429, 1975.

WENDEL NETO, S. Risco da transmissão por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil . **Tese**. Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 404p, 2005.

WHO. Control of Chagas Disease, Geneva **Technical Report Series** nº811, 91pp, 1991.

WHO. Control of Chagas Disease Geneva World Health Organization, **Technical Report Series** nº905, 96p, 2002.

GLOSSÁRIO

Análise prévia - a efetuada em determinados produtos sob o regime de vigilância sanitária, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro.

Análise fiscal - a efetuada sobre os produtos submetidos ao sistema instituído pela legislação, em caráter de rotina, para a apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual.

Análise controle - é a análise efetuada em produtos sob o regime de vigilância sanitária, após sua entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro.

Anticorpos - produzido pelo sistema imune em resposta a um agente externo que pode ser vírus ou bactéria.

Antígenos - é a parte do vírus ou bactéria que o sistema imune reconhece como ser estranho.

Assintomático - indivíduo infectado, contudo, não apresenta sinais ou sintomas referentes à doença.

Especificidade Clínica ou Diagnóstica - Incidência de resultados verdadeiramente negativos, obtidos quando o teste é aplicado em indivíduo sabidamente não portadores da doença em estudo.

Falso Negativo (FN) - ensaio com resultado negativo obtido de amostra de indivíduo infectado.

Falso Positivo (FP) - ensaio com resultado positivo obtido de amostra de indivíduo não infectado.

Ponto de corte (“cut off”- CO) - corresponde à média das leituras dos resultados negativos mais dois ou três desvios padrão.

Plasma sanguíneo - é o componente líquido do sangue, no qual as células estão suspensas. O plasma é um líquido de cor amarelada e é o maior componente único do sangue, compondo cerca de 55% do volume total de sangue.

Produto para Diagnóstico de Uso in vitro: reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, junto com as instruções para seu uso, que contribuem para realizar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa de uma amostra proveniente do corpo humano e que não estejam destinados a cumprir alguma função anatômica, física ou terapêutica, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para prover informação sobre amostras obtidas do organismo humano.

Registro de produto: ato privativo do órgão ou entidade competente do Ministério da Saúde, após avaliação e despacho concessivo de seu dirigente, destinado a comprovar o direito de fabricação e de importação de produto submetido ao regime da Lei nº 6360, de 1976, com a indicação do nome, do fabricante, da origem, da finalidade e dos outros elementos que o caracterizem

Sensibilidade Clínica ou Diagnóstica - Incidência de resultados verdadeiramente positivos, obtidos quando um teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em estudo.

Serviço de Hemoterapia - entidade com a finalidade de prestar assistência e apoio hemoterápico e/ou hematológico à rede de serviços de saúde.

Soro sanguíneo – porção líquida que se separa após a coagulação do sangue

Testes Confirmatórios - quando um teste suplementar é utilizado para confirmar um diagnóstico inicial positivo

Verdadeiro Positivo (VP) - ensaios sucessivos com resultados positivos obtidos de uma amostra de indivíduo infectado.

Verdadeiro Negativo (VN) - ensaios sucessivos com resultados negativos obtido de uma amostra de indivíduo não infectado.