

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1
no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica
para doença de Chagas em bancos de sangue**

por

Laura Cotta Repolês

Belo Horizonte

Agosto/2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1
no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica
para doença de Chagas em bancos de sangue**

por

Laura Cotta Repolês

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias**

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Co-orientação: Dra. Fernanda Freire Campos Nunes

Belo Horizonte

Agosto/2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R425a Repolês, Laura Cotta.
2014

Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue / Laura Cotta Repolês. – Belo Horizonte, 2014.

XXI, 113 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 112-134

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doença de Chagas/sangue 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. Testes sorológicos/métodos 4. Citometria de fluxo/utilização I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Nunes, Fernanda Freire Campos (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1
no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica
para doença de Chagas em bancos de sangue**

por

Laura Cotta Repolês

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Freire Campos Nunes

Prof.^a Dr.^a Roberta Dias Rodrigues Rocha

Prof.^a Dr.^a Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Suplente: Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Dissertação defendida e aprovada em: 27/08/2014

Dedico este trabalho à minha família, aos meus orientadores
e a todos aqueles que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tantas bênçãos recebidas e pelas pessoas que Ele colocou em minha vida, por me proporcionar a oportunidade de estudar e de desenvolver este projeto,

À minha orientadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo pela confiança e incentivo, pelo acompanhamento pontual e competente, pelos ensinamentos, conselhos e amizade, pelos exemplos de dedicação, profissionalismo e serenidade.

À minha co-orientadora Dra. Fernanda Freire Campos Nunes pelo carinho com que me aceitou como aluna, pela disposição, boa vontade, por todo ensinamento e empenho na realização deste trabalho.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela oportunidade de realizar este projeto, pela contribuição preciosa na análise dos resultados e pelas sugestões oportunas, paciência e entusiasmo contagiante.

À Dra. Andrea Teixeira de Carvalho pela colaboração, pelo apoio e pela concessão de importantes fontes bibliográficas utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Eduardo de Castro Ferreira e à Dra. Amália Verônica pela contribuição em minha formação e por me incentivarem na carreira científica.

Aos membros do Laboratório de Leishmanioses (LALEI) pela amizade, pela convivência agradável e pelos momentos de alegria e descontração vividos.

Aos membros do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) pelo carinho com que me receberam e pelo auxílio prestado de maneira constante.

À toda equipe responsável pelo desenvolvimento e padronização da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 pela qualidade do trabalho realizado, possibilitando a realização deste estudo.

À Carolina Camargos e Arthur Castro pelo auxílio técnico e por compartilharem comigo a busca pelo aprendizado.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) por proporcionar a infraestrutura e as condições necessárias à realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR/FIOCRUZ por possibilitar a convivência e o aprendizado com grandes cientistas, que são referências em ensino e pesquisa.

À Fundação HEMOMINAS, Fundação HEMOPE e Fundação PRÓ-SANGUE pela colaboração com este estudo através do envio de dados e amostras de soro dos doadores de sangue.

Aos meus pais, José Maria e Ana Maria, por se fazerem sempre presentes em minha vida, oferecendo apoio e amor incondicionais.

Aos meus amados irmãos, cunhados, sobrinhos e demais familiares pela torcida, pelo incentivo e pelos prazerosos momentos que sempre passamos juntos.

Ao meu marido, Gustavo, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, felicidade e cumplicidade que compartilhamos.

Aos membros da FCVV e demais amigos pela presença alegre, pelas palavras de otimismo e amizade sincera.

À todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e torceram por mim, muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos recebida durante o curso.

Às instituições financiadoras que viabilizaram este estudo: CNPq, FAPEMIG e CPqRR.

Se eu vi mais longe,
foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
4.1 Doença de Chagas.....	28
4.1.1 Aspectos gerais	28
4.1.2 Epidemiologia.....	30
4.1.3 Mecanismos de transmissão.....	33
4.1.4 Imunidade	35
4.1.5 Diagnóstico	36
4.1.5.1 Diagnóstico laboratorial na doença de Chagas aguda	37
4.1.5.2 Diagnóstico laboratorial na doença de Chagas crônica	37
4.1.6 Reação cruzada entre T. cruzi e Leishmania spp.....	43
4.2 Bancos de sangue.....	44
4.2.1 História.....	45
4.2.2 Requisitos básicos e impedimentos para doação de sangue	46
4.2.3 Etapas da doação de sangue/ciclo do sangue.....	47
4.2.4 Triagem sorológica para doença de Chagas em hemocentros	49
4.3 Metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1).....	54
4.3.1 Histórico do desenvolvimento	54

4.3.2	Padronização	57
4.3.3	Estudos pilotos	58
4.3.4	Vantagens do método.....	63
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
5.1	Delineamento do estudo.....	64
5.2	Hipóteses do estudo	64
5.3	Variáveis do estudo.....	64
5.4	População e amostra	65
5.5	Área e local do estudo.....	65
5.6	Instrumentos e procedimentos de coleta de dados.....	67
5.6.1	Coleta e processamento das amostras	67
5.6.2	Estudo sobre esclarecimento diagnóstico	67
5.6.3	Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem.....	69
5.6.4	Métodos convencionais de diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....	70
5.6.4.1	Ensaio imunoenzimático convencional (ELISA) e recombinante (recELISA)	71
5.6.4.2	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	71
5.6.5	Metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1).....	72
5.6.5.1	Obtenção e preparo dos parasitos	72
5.6.5.2	Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo	73
5.6.5.3	Obtenção dos dados de citometria de fluxo	75
5.6.5.4	Interpretação dos resultados.....	77
5.7	Análise estatística	79
5.8	Considerações éticas	79
6	RESULTADOS	80
6.1	Estudo sobre esclarecimento diagnóstico	80
6.1.1	Caracterização das amostras estudadas.....	80
6.1.2	Triagem sorológica para doença de Chagas através dos testes ELISA-I, ELISA-II e RIFI.....	80

6.1.3 Confirmação do diagnóstico da doença de Chagas através dos métodos recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1	81
6.1.3.1 Avaliação dos métodos confirmatórios segundo o consenso do Ministério da Saúde para diagnóstico da doença de Chagas	82
6.1.4 Comparação da reatividade dos testes de triagem e dos métodos confirmatórios	83
6.1.5 Comparação da reatividade dos métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1	86
6.1.5.1 Reatividade dos métodos confirmatórios em relação aos testes de triagem no grupo de amostras DISC _T	88
6.1.5.2 Reatividade diferencial do FC-TRIPLEX-IgG1 comparada à reatividade do recELISA em amostras DISC _T	91
6.2 Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem	92
7 DISCUSSÃO	94
7.1 Estudo sobre esclarecimento diagnóstico	94
7.2 Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem	104
8 CONCLUSÕES	107
9 PERSPECTIVAS	109
10 ANEXO	111
10.1 Anexo A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (N.157/2007).	111
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . A: epimastigotas em cultura; B: tripomastigota em esfregaço sanguíneo; C: amastigotas em tecido	28
Figura 2: Eliminação do <i>Triatoma infestans</i> do Brasil de 1975 a 2006	31
Figura 3: Estimativa global da população infectada pelo <i>T. cruzi</i>	32
Figura 4: Principais espécies de triatomíneos que transmitem a doença de Chagas. A: <i>Triatoma infestans</i> ; B: <i>Panstrongylus megistus</i> ; C: <i>T. brasiliensis</i> ; D: <i>T. pseudomaculata</i> ; E: <i>T. sordida</i>	33
Figura 5: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	34
Figura 6: Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em esfregaço sanguíneo	37
Figura 7: A: Representação esquemática da reação de HAI. B: Visualização de amostra reagente, não reagente e indeterminada.....	38
Figura 8: A: Representação esquemática da RIFI. B: Visualização do resultado no microscópio de fluorescência	39
Figura 9: Representação esquemática do ELISA	40
Figura 10: A: Representação esquemática do Western blot. B: Detalhe da etapa final: revelação da proteína	41
Figura 11: Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo	42
Figura 12: Fluxograma do ciclo do sangue	49
Figura 13: Algoritmo para testagem e liberação de bolsas de sangue na triagem sorológica para doença de Chagas em hemocentros	53
Figura 14: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com FITC em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI).....	59
Figura 15: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com FITC em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI).....	60
Figura 16: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com Alexa Flúor647 em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI).....	61
Figura 17: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com Alexa Flúor647 em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI).....	62
Figura 18: Localização dos hemocentros participantes do estudo	66

Figura 19: Fluxograma da metodologia do estudo sobre o esclarecimento diagnóstico e sobre a monitoração sorológica pós-triagem.....	70
Figura 20: Representação esquemática do FC-TRIPLEX-IgG1	75
Figura 21: Representação esquemática da sequência de análises dos dados obtidos por citometria de fluxo: seleção da população de tripanosomatídeos de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade e histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP)	77
Figura 22: Algoritmo para interpretação dos resultados do FC-TRIPLEX-IgG1	78
Figura 23: Distribuição das amostras do estudo de acordo com o hemocentro de origem	80
Figura 24: Resultados dos testes de triagem e dos métodos confirmatórios para diagnóstico da doença de Chagas realizados no estudo.....	82
Figura 25: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios <i>versus</i> testes de triagem de acordo com o consenso do Ministério da Saúde para o diagnóstico da doença de Chagas	83
Figura 26: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados não negativos na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.....	87
Figura 27: Concordância entre os métodos confirmatórios FC-TRIPLEX-IgG1 e recELISA no esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.....	88
Figura 28: Reatividade comparativa no método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 <i>versus</i> testes de triagem no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados discordantes (DISC _T) para doença de Chagas em bancos de sangue	89
Figura 29: Reatividade comparativa no método confirmatório recELISA <i>versus</i> testes de triagem no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados discordantes (DISC _T) para doença de Chagas em bancos de sangue	90
Figura 30: Reatividade diferencial no método FC-TRIPLEX-IgG1 em amostras com resultados discordantes (DISC _T) em testes de triagem para doença de Chagas em bancos de sangue	92
Figura 31: Reatividade no método recELISA nos subgrupos identificados no FC-TRIPLEX-IgG1	92
Figura 32: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios <i>versus</i> testes de triagem na monitoração sorológica de doadores com antecedente de não negatividade para doença de Chagas em bancos de sangue	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados possíveis do FC-TRIPLEX-IgG1 em soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH) e leishmaniose tegumentar (LT).	79
Tabela 2: Casos positivos, negativos e concordância de cada técnica de triagem comparados aos resultados do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1.	84
Tabela 3: Casos positivos, negativos e concordância de cada técnica de triagem comparados aos resultados do método confirmatório recELISA.	84
Tabela 4: Reatividade comparativa em testes de triagem <i>versus</i> métodos confirmatórios em amostras não negativas na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

µL: microlitro

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CH: doença de Chagas

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DAT: *direct agglutination test* (teste de aglutinação direta)

DC: doença de Chagas

DNA: *desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

FC-AFEA: reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi*

FC-AFPA: reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas promastigotas fixadas de *Leishmania*

FC-ALTA: reação de imunofluorescência por citometria de fluxo anti-formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FL: fluorescência

FL-2: fluorescência do tipo 2

FL-4: fluorescência do tipo 4

FSC: *forward scatter* (dispersão frontal - tamanho)

HAI: hemaglutinação indireta

HEMOMINAS: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

HEMOPE: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IC: intervalo de confiança

IgG: imunoglobulina da classe G

IgG1: imunoglobulina da classe G e subclasse 1

IgG2: imunoglobulina da classe G e subclasse 2

IgM: imunoglobulina da classe M

LIT: *liver infusion tryptose medium*

LMCo: lise mediada por complemento

LT: leishmaniose tegumentar

LV: leishmaniose visceral
mL: mililitro
MS: Ministério da Saúde
MSF: Médicos sem Fronteiras
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde
PAHO: *Pan American Health Organization* (Organização Pan-Americana da Saúde)
PBS: *phosphate buffered saline* (salina tamponada com fosfato)
PCR: *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PPFP: percentual de parasitos fluorescentes positivos
PRÓ-SANGUE: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de São Paulo
recELISA: ELISA recombinante
RIFI: reação de imunofluorescência indireta
rpm: rotações por minuto
ROC: *receiver operating characteristic curve*
rpm: rotações por minuto
SAPA: *shed acute phase antigen*
SAPE: *streptoavidin phicoeritrin* (estreptoavidina ficoeritrina)
SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida
SFB: soro fetal bovino
SSC: *side scatter* (dispersão lateral - granulosidade)
SUS: Sistema Único de Saúde
TESA: antígenos excretados-secretados de tripomastigotas
vs.: *versus*
WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

A triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue, obrigatória no Brasil desde 1969, aliada ao desenvolvimento de métodos para detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* cada vez mais sensíveis, permitiram a diminuição da transmissão transfusional desta doença. No entanto, os resultados não negativos (positivos ou indeterminados/inconclusivos) e a discordância entre testes aumentaram consideravelmente, passando a representar um grande desafio para os hemocentros. Outro desafio está relacionado à reinclusão de indivíduos não negativos em triagens prévias como potenciais doadores. Resultados falso-positivos e inconclusivos promovem o descarte desnecessário de bolsas de sangue, além de rotular pessoas saudáveis como portadoras de uma doença grave. Assim, verifica-se a necessidade de desenvolver métodos capazes de distinguir com segurança resultados positivos verdadeiros dos falsos, além de resolver os resultados indeterminados. Neste contexto, o FC-TRIPLEX-IgG1 se apresenta como um método confirmatório inovador para o diagnóstico diferencial da doença de Chagas, leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar em plataforma única, utilizando citometria de fluxo. O objetivo deste estudo foi verificar o desempenho desta nova metodologia para o esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas (n=91) e para o monitoramento sorológico de indivíduos com antecedente de não negatividade (n=100) na triagem para doença de Chagas realizada em três grandes hemocentros brasileiros. Para isto, as amostras foram triadas com os métodos ELISA (I e II) e RIFI e, em seguida, foram realizados os métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1. Os resultados mostraram alta discordância entre os testes de triagem (78,0%), além de grande número de reações indeterminadas. Nas amostras positivas em todos os testes de triagem, o FC-TRIPLEX-IgG1 e o recELISA apresentaram desempenho semelhante na confirmação dos resultados. Porém, o desempenho dos métodos no esclarecimento diagnóstico das amostras discordantes foi diferente ($p=0,001$). O FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em muitas amostras positivas no ELISA-I e indeterminadas na RIFI, sugerindo sua aplicabilidade na confirmação de resultados e no esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas. Já o recELISA foi positivo em muitas amostras negativas nos outros testes, o que mostrou sua baixa especificidade neste estudo. O teste de maior concordância com o FC-TRIPLEX-IgG1 foi a RIFI ($k=0,5$), seguida do ELISA-I ($k=0,5$), recELISA ($k=0,2$) e ELISA-II ($k=0,2$). O FC-TRIPLEX-IgG1 foi capaz de realizar o diagnóstico diferencial e também se mostrou útil na monitoração sorológica de indivíduos com antecedente de não negatividade na triagem para doença de Chagas, com 98,0% de concordância em amostras ELISA-RIFI- e 94,0% de concordância em amostras ELISA+RIFI+. Os resultados deste estudo sugerem que o FC-

TRIPLEX-IgG1 é uma ferramenta promissora, de alta especificidade e desempenho, que pode ser aplicada em hemocentros para auxiliar no esclarecimento diagnóstico de resultados indeterminados/inconclusivos na triagem sorológica para doença de Chagas e na monitoração sorológica periódica de indivíduos com precedente de não negatividade, visando sua exclusão ou reinclusão como possível doador.

ABSTRACT

The serological screening for Chagas' disease in blood banks, mandatory in Brazil since 1969, together with the development of methods for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies increasingly sensitive, allowed the reduction of transfusion transmission of this disease. However, non-negative results (positive or indeterminate) and the discrepancy between tests increased considerably, and now represent a big challenge for blood banks. Another challenge is related to the re-inclusion of non-negative individuals in previous trials as potential donors. False-positive and inconclusive results further unnecessary disposal of blood bags, and label healthy people as having a serious illness. Thus, there is a need to develop methods capable of reliably distinguish true and false positive results, solving indeterminate results too. In this context, the FC-TRIPLEX-IgG1 presents itself as an innovative confirmatory method for the differential diagnosis of Chagas disease, visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis in a single platform, using flow cytometry. The aim of this study was to verify the performance of this new method to clarify the diagnosis of non-negative ($n = 91$) samples and to serological monitoring of individuals with a history of non-negativity ($n = 100$) in screening for disease testing Chagas performed in three major Brazilian blood centers. The samples were screened by the methods ELISA (I and II) and IFI and then the confirmatory methods recELISA and FC-TRIPLEX-IgG1 were performed. The results showed high discordance between screening tests (78.0%) and large number of indeterminate reactions. In positive samples in all screening tests, the FC-TRIPLEX-IgG1 and recELISA showed similar performance in confirmation of the results. However, the performance of the methods in diagnostic clarification of discordant samples was different ($p=0.001$). The FC-TRIPLEX-IgG1 was positive in many samples positive in ELISA-I and indeterminate in IFI, suggesting its applicability in confirmation of results and in clarifying the diagnosis of non-negative samples. Already recELISA was positive in many negative samples in all other tests, which showed a low specificity in this study. The test for a greater agreement with the FC-TRIPLEX-IgG1 was IFI ($k=0.5$), then the I-ELISA ($k=0.5$), recELISA ($k=0.2$) and ELISA-II ($k=0.2$). The FC-TRIPLEX-IgG1 was able to perform the differential diagnosis and also proved useful in the serological monitoring of individuals with a history of non-negativity in screening for Chagas disease, with 98.0% agreement in RIFI-ELISA- samples and 94.0% of agreement in ELISA+IFI+ samples. The results of this study suggest that FC-TRIPLEX-IgG1 is a promising tool, that has high specificity and performance, which can be applied to blood banks to assist in diagnosis clarifying indeterminate results in serological screening for

Chagas disease and in periodic serological monitoring individuals with precedent of non-negativity, for their re-inclusion or exclusion as a possible donor.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma enfermidade fatal e silenciosa. Foi descrita pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909) e tem como agente etiológico o parasito *Trypanosoma cruzi*, que apresenta ciclo evolutivo do tipo heteroxênico, com estágios em hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Esta doença constitui um grande desafio para a saúde pública, com prevalência de infecção humana em 21 países do continente americano. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 65 milhões de pessoas corram o risco de serem infectadas pelo *T. cruzi* por viverem em áreas endêmicas e que cerca de 6 a 8 milhões estejam infectadas, principalmente na América Latina (OPAS, 2014). No Brasil, a doença humana ocorre em uma população de aproximadamente quatro milhões de indivíduos e mais de 28 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contaminação (Massad, 2008).

Por se tratar de uma doença crônica capaz de acarretar incapacidade e debilidade, a doença de Chagas constitui um problema médico-social, com grande impacto sócio-econômico-cultural, responsável por elevado número de aposentadorias precoces (Oliveira et al., 2011; Gomes et al., 2012). Além disso, a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos é bastante significativa, constituindo a terceira principal causa de óbitos (13,5%) entre as doenças infecciosas e parasitárias. Na década de 1980, aproximadamente 6.000 óbitos por ano foram relacionados à doença de Chagas (Silveira e Rezende, 1994; MS, 1999) e em 2003 esta quantidade se manteve praticamente a mesma, com 5.938 óbitos (Santo, 2007).

A forma de transmissão de maior importância epidemiológica está relacionada com a picada e o contato com as fezes do inseto vetor, triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, que apresentam distribuição heterogênea nos estados brasileiros. A transmissão vetorial está basicamente relacionada às relações sócio-econômicas, onde falta de higiene, pobreza, precariedade de moradia, subemprego, analfabetismo e uma extrema fragilidade política são elementos fundamentais desse contexto. Entretanto, a infecção pelo *T. cruzi* também pode ser adquirida através da transmissão congênita, oral, por doação de órgãos e transfusão sanguínea (OMS, 2014).

A transmissão direta do *T. cruzi* através da transfusão sanguínea ocorre em parcela menor, mas não pouco significativa, e está relacionada à qualidade do sistema de saúde e aos fatores de migração interna, que progressivamente carregam doadores infectados para os centros urbanos, onde ocorrem as transfusões de sangue (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). Essa situação merece atenção especial, uma vez que indivíduos infectados na infância

e adolescência podem permanecer na forma crônica indeterminada (assintomática) pelo resto de suas vidas e serem doadores de sangue em potencial até os 60 anos de idade (Ribeiro e Rocha, 2000).

No início da década de 1980, a prevalência de sorologia positiva para a doença de Chagas na população brasileira era de 7% (Moraes-Souza, 1999; Schmunis e Cruz, 2005), sendo de 4,2% na década anterior (Prata, 2001). Esse aumento preocupante na soroprevalência incentivou os órgãos de saúde a criarem uma campanha nacional de combate à doença de Chagas que incluía, entre seus objetivos, a erradicação do principal vetor, *Triatoma infestans*, e a criação do Programa Nacional do Sangue (PNS) pelo Ministério da Saúde, através da portaria nº 07/80. Entre outras medidas de grande importância, o programa tornou compulsória, em centros credenciados de hemoterapia, a realização de pelo menos dois testes sorológicos com princípios diferentes na triagem para doença de Chagas (MS, 2011).

O esforço conjunto foi extremamente efetivo e as ações de combate sistêmico ao vetor fizeram com que a transfusão sanguínea se tornasse o principal mecanismo de transmissão na maioria dos países endêmicos. Contudo, a cobertura sorológica dos doadores, aliada ao maior controle da doença de Chagas, resultou na queda dos índices de prevalência sorológica de 3,2% no início da década de 1990 (Schmunis e Cruz, 2005) para 0,2% em 2005 no Brasil (OPAS, 2006) e o índice de transmissão anual, via transfusão de sangue, de 20.000 para 13 em quatro décadas (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011).

Desde então, tem-se observado uma melhora evidente na qualidade dos testes empregados em triagem sorológica, através da utilização de técnicas cada vez mais sensíveis (Wanderley et al., 1993; Sáez-Alquezar et al., 1998). Entretanto, paralela à diminuição da transmissão transfusional, surgiu um novo problema, decorrente do aumento do número de pacientes com resultados sorológicos inconclusivos ou não negativos (Carrasco et al., 1985).

Os métodos laboratoriais empregados no diagnóstico da doença de Chagas possuem sensibilidade e especificidade diferentes dependendo da fase da doença, se aguda ou crônica. Na fase aguda, com uma parasitemia elevada, a detecção direta do parasito no sangue é a forma mais simples e usual de diagnóstico, apresentando sensibilidade de 90% a 100%. Nessa fase, métodos de pesquisa indireta como o xenodiagnóstico e a hemocultura também são altamente recomendados, alcançando índices de sensibilidade de 100% (OMS, 2002).

Já na fase crônica da doença o nível de parasitemia diminui significativamente e, portanto, os métodos de pesquisa direta do parasito possuem menos de 10% de sensibilidade e os métodos indiretos de 20% a 50%. Nessa fase, os métodos sorológicos são os mais

empregados, dentre eles: hemaglutinação indireta (HAI), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e os imunoenaios enzimáticos (ELISA) (MS, 2010b).

Os métodos sorológicos utilizados atualmente na triagem para doença de Chagas em bancos de sangue e no diagnóstico em laboratórios baseiam-se na formação de imunocomplexos antígeno-anticorpo. Eles têm como vantagens a facilidade de execução, bem como a obtenção e padronização dos reagentes. Contudo, apresentam protocolos distintos e desempenhos variáveis, decorrentes principalmente da oscilante especificidade (Luquetti e Rassi, 2000), que pode resultar em resultados falso-positivos ou inconclusivos.

A baixa especificidade dos testes está associada, na maioria dos casos, à reatividade cruzada dos anticorpos com antígenos ubíquos encontrados em parasitos pertencentes à mesma família Trypanosomatidae, como é o caso do *T. cruzi* e da *Leishmania* spp. (Vexenat et al., 1996). Este problema, que assume proporções ainda maiores quando projetado na realidade de regiões co-endêmicas para doença de Chagas e leishmanioses, evidencia-se nos resultados discordantes observados por Luquetti e Rassi (2000) nos laudos emitidos por diferentes laboratórios utilizando os mesmos métodos sorológicos.

Assim, diante da percepção da necessidade de aprimorar o desempenho dos testes sorológicos para doença de Chagas, visando o diagnóstico correto e principalmente a triagem segura em hemocentros para a prevenção da transmissão transfusional da infecção pelo *T. cruzi*, surgiu a “Metodologia Triplex” (FC-TRIPLEX-IgG1). Ela foi desenvolvida, otimizada e padronizada pela equipe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), sendo uma nova ferramenta em sorologia não convencional que utiliza a citometria de fluxo para a pesquisa simultânea de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi*, anti-*L. braziliensis* e anti-*L. chagasi*.

Embora os parasitos fixados utilizados no FC-TRIPLEX-IgG1 possuam características morfométricas semelhantes, eles apresentam aspectos fluorogênicos distintos, pois são marcados com diferentes concentrações de fluorocromo. Após marcação, os parasitos são combinados em plataforma única, possibilitando a análise simultânea de diferentes anticorpos anti-tripanosomatídeos em um único teste de imunofluorescência.

Na etapa de leitura, a citometria de fluxo é empregada como método de segregação dos parasitos e amplificação dos sinais de fluorescência. Esta ferramenta, que há muito é utilizada em análises hematológicas, inclusive em bancos de sangue, e também no diagnóstico de diversas doenças, trouxe uma nova perspectiva para o diagnóstico da doença de Chagas (Cordeiro et al., 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um problema de saúde pública na América Latina. Com a implementação das medidas de controle dos insetos vetores, as formas de transmissão com menor importância epidemiológica ganharam maior notoriedade, dentre elas a transfusão sanguínea (Dias, 2009).

A aplicação de dois testes de princípios distintos para triagem sorológica da doença de Chagas em doadores de sangue, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (MS, 2004a), permitiu a elevação da sensibilidade de detecção do parasito e a almejada diminuição da transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea. Por outro lado, surgiu um novo problema relacionado à discordância entre os resultados e a baixa especificidade destes testes, com considerável aumento do número de amostras não negativas, que englobam tanto as verdadeiramente positivas quanto as falso-positivas e as inconclusivas. Isso faz com que muitos indivíduos sadios sejam rotulados como portadores de uma doença grave, além de promover um significativo descarte desnecessário de unidades de sangue nos hemocentros e importantes perdas financeiras para o Sistema Único de Saúde (SUS) (Moraes-Souza et al., 2006b; de Marchi et al., 2007).

Segundo o Relatório Final da XV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas (Yasuda, 2000), estima-se que sejam colhidas cerca de 2.800.000 bolsas de sangue por ano no Brasil, sendo 60% no setor público e 40% no setor privado. Do total de doações, cerca de 1% apresenta sorologia não negativa para doença de Chagas. Cerca de 10-15% destas são confirmadamente positivas e 85-90% apresentam resultados inconclusivos em dois testes com princípios diferentes realizados na mesma amostra. Do total de pacientes com resultados inconclusivos, somente 2% a 3% são confirmados como verdadeiros positivos utilizando métodos convencionais (como ELISA, RIFI e HAI), enquanto a grande maioria, cerca de 20.000, permanece sem diagnóstico definitivo. Tal situação não é particular da triagem sorológica em bancos de sangue e encontra-se presente também na realidade dos laboratórios clínicos que realizam sorologia para doença de Chagas.

Assim, o elevado número de reações não negativas para doença de Chagas reforça a necessidade real e urgente de desenvolver testes sorológicos confirmatórios mais específicos, práticos e rápidos, passíveis de serem introduzidos nas rotinas dos laboratórios clínicos e nos serviços de hemoterapia para realizar o esclarecimento diagnóstico, reduzindo tanto o descarte desnecessário de bolsas de sangue quanto a dificuldade na condução de doadores com reações não negativas.

Outro fator importante a ser analisado é que, embora as leishmanioses atualmente não sejam consideradas na prática rotineira dos serviços de hemoterapia, estudos têm sugerido a possibilidade de transmissão da leishmaniose visceral por transfusão sanguínea e transplante de órgãos, havendo, portanto, expectativa de inserção da triagem sorológica para esta doença em bancos de sangue e tecido (de Oliveira Filho, 2013; Monteiro, 2013). Estudo realizado com doadores e receptores de órgãos em área endêmica para leishmaniose visceral apontou a alta prevalência de infecção assintomática por *L. infantum* (Clemente et al., 2014) e, de acordo com Morales et al. (2001), o aumento da incidência de leishmaniose nos doentes com infecção por HIV/SIDA e os surtos entre toxicod dependentes de drogas endovenosas demonstram que a infecção pode ser transmitida eficazmente pelo sangue.

Com desenvolvimento da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 e tendo em vista os resultados prévios que demonstraram sua excelente performance, nos propusemos a avaliar, neste estudo, o desempenho da nova metodologia frente aos métodos convencionais no esclarecimento das situações diagnósticas não negativas e na monitoração sorológica de indivíduos com antecedente de não negatividade na triagem para doença de Chagas em bancos de sangue. Os resultados deste estudo serão utilizados na validação da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1, com a qual espera-se minimizar a quantidade de amostras inconclusivas, além de contribuir para a identificação de indivíduos portadores de leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar na triagem sorológica em hemocentros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 no esclarecimento diagnóstico e na monitoração sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o desempenho do FC-TRIPLEX-IgG1 em relação aos métodos convencionais para o esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue;

Avaliar o desempenho do FC-TRIPLEX-IgG1 na monitoração de indivíduos com antecedente de não negatividade na triagem sorológica para doença de Chagas realizada há 10 anos em bancos de sangue.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Doença de Chagas

4.1.1 Aspectos gerais

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença parasitária sistêmica, de natureza endêmica e evolução crônica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Figura 1). Ela é considerada uma zoonose e apresenta uma cadeia epidemiológica complexa, que inclui numerosos vertebrados reservatórios e insetos triatomíneos transmissores, o que torna impossível sua erradicação (MS, 2004a; Santo, 2009).

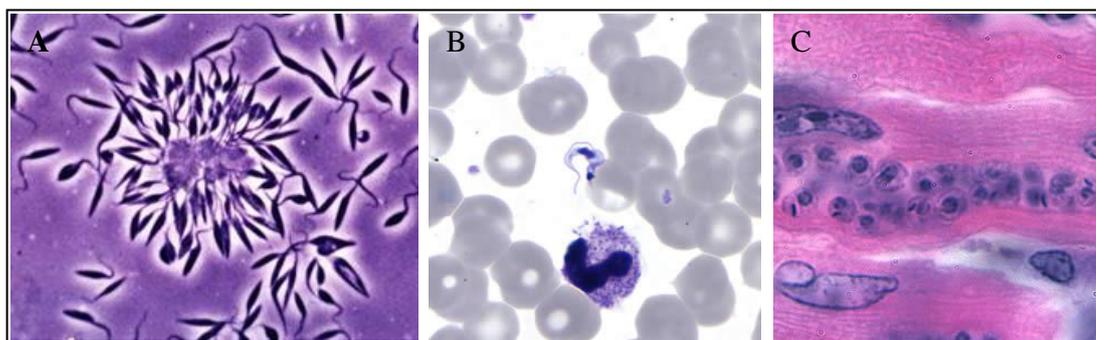


Figura 1: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A: epimastigotas em cultura; B: tripomastigota em esfregaço sanguíneo; C: amastigotas em tecido. Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html>.

Foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico sanitário Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, após dois anos de investigações em Lassance (MG) e em Manguinhos (FIOCRUZ/RJ). A descoberta ocorreu ao examinar o sangue de uma criança febril chamada Berenice, onde ele verificou a presença do mesmo protozoário que já havia encontrado em insetos hematófagos e em diversas espécies de animais da região. Carlos Chagas nomeou o protozoário e passou a estudar tanto o agente etiológico quanto os hospedeiros, reservatórios e diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença (OMS, 2014).

A doença apresenta dois estágios em seres humanos: uma fase aguda, que ocorre pouco tempo após a infecção, e uma fase crônica, que se desenvolve ao longo de muitos anos e pode ser indeterminada ou sintomática. As manifestações patológicas que podem estar presentes em ambas as fases são consequência de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito, como a variabilidade das cepas, o tropismo e a antigenicidade (Andrade,

2000) quanto ao hospedeiro, como a faixa etária, o estado nutricional e, principalmente, o estado imunológico (Dias, 2000).

A fase aguda da doença de Chagas dura cerca de 2 meses, sendo assintomática na grande maioria dos casos (Lescure et al., 2010). No entanto, pode ocorrer inchaço ocular unilateral (sinal de Romana) ou lesão inflamatória na pele (chagoma de inoculação), em caso de transmissão vetorial, e manifestações clínicas como febre prolongada, dor de cabeça, dor muscular, palidez, edema localizado e generalizado, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, dentre outras, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (Schofield et al., 2006; Oliveira et al., 2010). A mortalidade durante esta fase é de até 10% e pode ser ainda maior em crianças devido à miocardite e meningoencefalite (Dias et al., 2000).

A fase crônica assintomática, indeterminada ou latente da doença de Chagas pode durar de 10 a 30 anos e apenas cerca de 20 a 35% dos indivíduos infectados progridem para um estágio crônico sintomático, o que depende dos estado imunológico e da cepa de *T. cruzi* (Sabino et al., 2010). Neste estágio, ocorrem danos progressivos e irreversíveis a diversos órgãos, especialmente coração, esôfago e cólon, ocasionando desordens cardíacas e digestivas cujas complicações podem levar à morte (Teixeira et al., 2006; Marcipar e Lagier, 2012). No Brasil, a forma assintomática é a mais comum (60% a 70% dos casos), seguida pelas formas cardíaca (20% a 40% dos casos) e digestiva (7% a 11% dos casos), sendo rara a forma cardio-digestiva (OMS, 2010a).

A droga disponível no Brasil para o tratamento da doença de Chagas é o Benzonidazol, que é administrado por via oral em esquemas prolongados e possui muitos efeitos colaterais. Embora o tratamento apresente alta efetividade na fase aguda para eliminação do parasito, sua eficácia diminui à medida que aumenta o tempo de infecção, sendo comum a ocorrência de falha terapêutica (Coura, 1996). Na fase crônica, a droga geralmente é usada na tentativa de prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença, mas nem sempre é indicada devido ao prognóstico incerto e à sua alta toxicidade (Biolo et al., 2010; Lescure et al., 2010; Coura e Borges-Pereira, 2011). O critério de cura é baseado na negatização dos exames parasitológicos e sorológicos, o que pode ocorrer de 10 a 25 anos após o início do tratamento (Pérez-Molina et al., 2009; Marcipar e Lagier, 2012). Métodos sorológicos não convencionais, alguns baseados na análise por citometria de fluxo, têm sido estudados com a finalidade de se obter um prognóstico precoce após tratamento (Krettli, 2009; Matos et al., 2011; Machado-de-Assis et al., 2012).

A profilaxia da doença de Chagas é centrada no combate sistemático ao vetor, na melhoria das condições de vida e de moradia da população, na educação sanitária das

comunidades, na cobertura sorológica dos doadores de sangue, com exclusão dos soropositivos ou suspeitos, e no tratamento dos infectados (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011; OMS, 2014). Estas e outras ações permanentes de vigilância epidemiológica são imprescindíveis para que altos patamares de controle sejam mantidos e focos emergentes, eliminados (Andrade, 2000; Diotaiuti et al., 2011).

4.1.2 Epidemiologia

A princípio a doença de Chagas era exclusivamente de animais e triatomíneos silvestres, sendo transmitida para os humanos a medida em que estes modificaram ou destruíram o ciclo silvestre natural e construíram as cafuas de pau-a-pique, barro e sapé (e também galinheiros e chiqueiros) na zona rural. Com a adaptação e a colonização destas construções pelos triatomíneos, formou-se um ciclo doméstico e peridoméstico independentes do ciclo silvestre, fazendo com que a doença se tornasse uma zoonose típica. Com o êxodo rural e migração de indivíduos infectados, a doença expandiu-se para as zonas periurbana e urbana, anteriormente livres da doença (Teixeira et al., 2001; de Lana e Tafuri, 2011).

A doença de Chagas constitui um sério problema de saúde pública, sendo uma das doenças parasitárias com maior impacto social, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade (OPAS, 2006; MSF, 2014). Ela é endêmica em 21 países das Américas, localizados em uma ampla região que se estende do México à Argentina. Sua distribuição ocorre em duas zonas ecológicas distintas: Cone Sul, onde os insetos vetores vivem em habitações humanas, e a zona constituída pelo sul da América do Norte, América Central e México, onde os vetores vivem dentro e fora dos domicílios (Morel e Lazdins, 2003).

Na América Latina, estima-se que cerca de 65 milhões de pessoas estejam sob o risco de adquirir a infecção pelo *T. cruzi*, sendo sua incidência de 28.000 novos casos por ano e sua prevalência de aproximadamente 6 a 8 milhões (mais de 98% destas sem diagnóstico e tratamento). Ela é responsável por 12.000 mortes anuais, sendo a doença parasitária que mais mata nas Américas (Guhl e Lazdins-Helds, 2007; OMS, 2010a; OPAS, 2014).

No Brasil, a prevalência estimada da doença de Chagas no final da década de 1970 através de inquérito sorológico era de aproximadamente 4,28%, sendo a população sob risco de cerca de 60 milhões. Já no final da década de 1990, novo inquérito sorológico da população geral foi realizado e a prevalência média foi calculada em 0,13%, com 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação e cerca de quatro milhões de indivíduos infectados (Shulman et al., 1997; Wendel, 2005; Massad, 2008; Marcipar e Lagier, 2012).

Com o apoio estratégico e político da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e em parceria com a comunidade científica nacional, diversas iniciativas para controle da doença de Chagas foram implementadas pelos governos dos países endêmicos. Atualmente no Brasil, com as estratégias de monitoramento entomológico e as melhorias habitacionais, a transmissão vetorial foi reduzida consideravelmente, atingindo um nível de controle muito elevado. Em 2006, o país recebeu o certificado de eliminação do principal vetor, o *T. infestans* e a prevalência da infecção tem sido cada vez menor na população mais jovem e nas crianças (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). A Figura 2 ilustra o mapa da certificação de controle da doença de Chagas nos estados no Brasil.

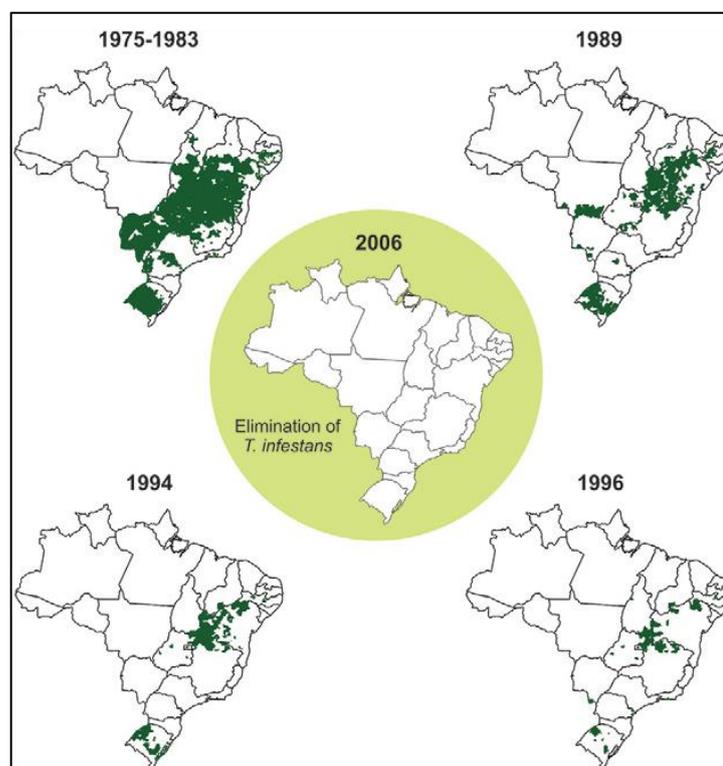


Figura 2: Eliminação do *Triatoma infestans* do Brasil de 1975 a 2006. Fonte: Coura, Dias, 2009.

Segundo Lucia Brum (2012), médica brasileira e consultora de doenças infecciosas emergentes da ONG internacional Médicos sem Fronteiras (MSF), apesar do *T. infestans* ter sido responsável por 80% dos casos de transmissão vetorial da doença de Chagas e o contágio através deste vetor tenha sido interrompido no Brasil, ainda há cerca de 140 espécies de barbeiro potencialmente transmissoras que não foram controladas. A consultora afirma que em mais de 13 anos de atuação da ONG nas Américas, 90 mil pessoas passaram por exames para doença de Chagas e cerca de 6.500 apresentaram resultado positivo e alerta, ainda, para o

fato de que o país se preocupa muito com o controle vetorial da doença, mas o tratamento aos infectados continua deficiente.

De fato, mesmo considerando os recentes sucessos na eliminação da transmissão vetorial por *T. infestans* em áreas endêmicas brasileiras e a redução do número de novos casos de 150 mil nos anos 1970 para cerca de 150 a 200 atualmente (Brum, 2012), a certificação não representa o controle efetivo da doença de Chagas, que ainda afeta cerca de 4 milhões de brasileiros. Na região amazônica ocorrem 90% dos novos casos e a doença se encontra em expansão, sendo transmitida principalmente por via oral.

Também não se pode falar em erradicação da doença, visto que espécies autóctones de triatomíneos como o *P. megistus* e o *T. brasiliensis* seguem na tentativa de colonização das casas e que a ocorrência do ciclo silvestre do *T. cruzi*, com grande número de reservatórios silvestres e a existência de pessoas já infectadas, limita a intervenção dos órgãos de saúde pública para o controle da transmissão (Diotaiuti et al., 2011).

Paralelamente à melhoria do panorama de controle da doença de Chagas em países endêmicos, com redução do número de casos, vem sendo constatada sua difusão via transfusão sanguínea para países não endêmicos como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e países da Europa Ocidental, como Portugal e Espanha (Figura 3). A internacionalização da doença é resultado dos grandes fluxos migratórios da América Latina para estes países, especialmente a partir da década de 1980 e que se intensificaram muito nos últimos anos, fazendo com que a doença seja atualmente um desafio mundial (Schmunis, 2007; Gascon et al., 2009; Bern et al., 2011; Cantley et al., 2012; Custer et al., 2012).

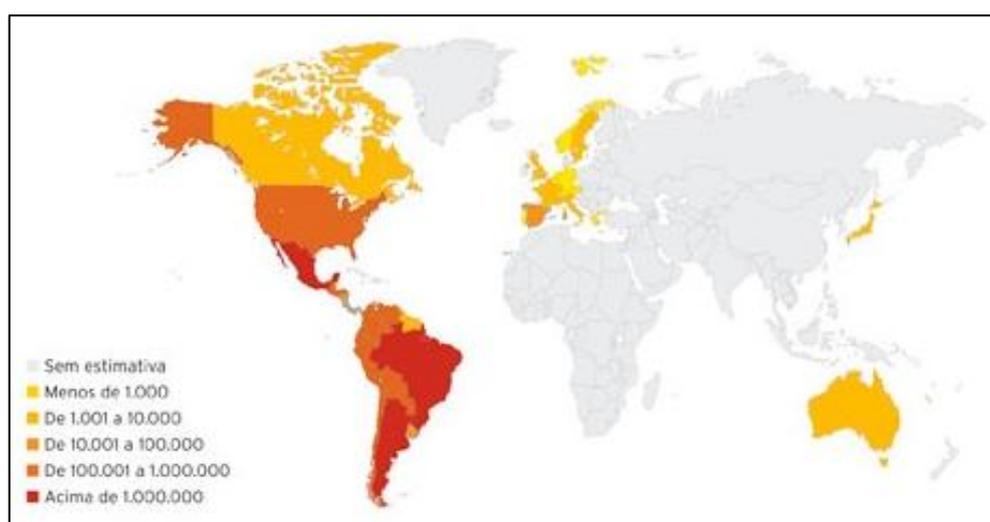


Figura 3: Estimativa global da população infectada pelo *T. cruzi*. Fonte: OPAS, 2009.

4.1.3 Mecanismos de transmissão

No mecanismo natural de infecção, o *T. cruzi* é transmitido para o homem e outros mamíferos domésticos (cães, gatos, porcos, ratos) e silvestres (tatus, gambás, primatas) através do contato com as fezes contaminadas do inseto vetor triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). Estes insetos, popularmente conhecidos como barbeiros, vivem em frestas de casas mal construídas, geralmente de adobe (mistura de argila e palha), na zona rural ou periurbana, têm hábitos noturnos e precisam ingerir sangue para sua evolução e procriação (MS, 2010b; Diotaiuti et al., 2011).

A transmissão vetorial é a que possui maior importância epidemiológica e chegou a representar mais de 80% dos casos (Dias, 2000). Cerca de 130 espécies de triatomíneos, a grande maioria silvestre, já foram descritas e todas são vetores potenciais do *T. cruzi*. Entretanto, algumas estão mais envolvidas na transmissão do parasito no Brasil por apresentarem maior antropofilia e capacidade de domiciliação: *Triatoma infestans* (recentemente eliminado), *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (OMS, 2003; Diotaiuti et al., 2011) (Figura 4).

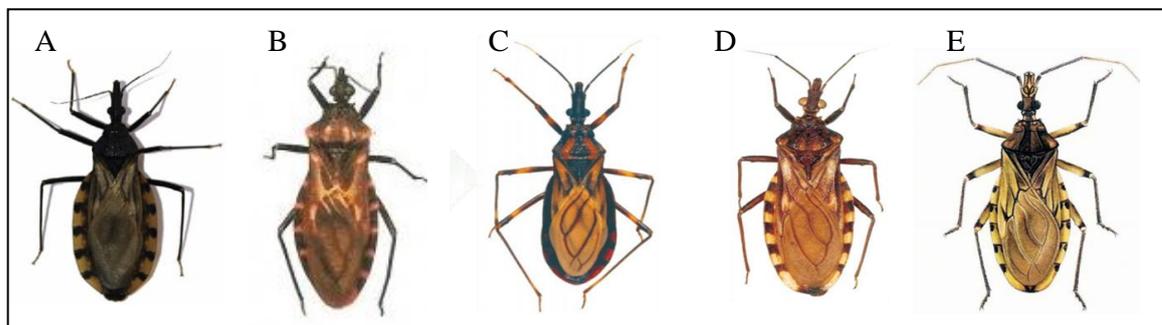


Figura 4: Principais espécies de triatomíneos que transmitem a doença de Chagas. A: *Triatoma infestans*; B: *Panstrongylus megistus*; C: *T. brasiliensis*; D: *T. pseudomaculata*; E: *T. sordida*. Fonte: FIOCRUZ, 2008.

Na transmissão vetorial, as tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes e urina do triatomíneo durante o hematofagismo penetram através do local da picada ou de outra solução de continuidade (Figura 5 A; B) e interagem com macrófagos e outras células do sistema monocítico fagocitário (SMF) da pele ou mucosas. Dentro destas células, as tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (Figura 5 C), que sofrem multiplicação por divisão binária simples e se transformam em tripomastigotas sanguíneas. Estas são liberadas no interstício após o rompimento da célula hospedeira devido à grande quantidade de parasitos (Figura 5 D). As tripomastigotas caem na corrente sanguínea, disseminam-se pelo

organismo e invadem outras células de qualquer tecido ou órgão, dando início a um novo ciclo celular (MS, 2010b; CDC, 2013) (Figura 5 D – C).

Os triatomíneos se infectam durante o hematofagismo em hospedeiros vertebrados, ao ingerir sangue contendo tripomastigotas circulantes (Figura 5 E). No estômago do inseto, elas evoluem para duas formas replicativas, esferomastigotas e epimastigotas, que proliferam (Figura 5 F; G) e, quando alcançam o reto, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes, sendo eliminados nas fezes ou na urina do vetor (MS, 2010b; CDC, 2013) (Figura 5 H).

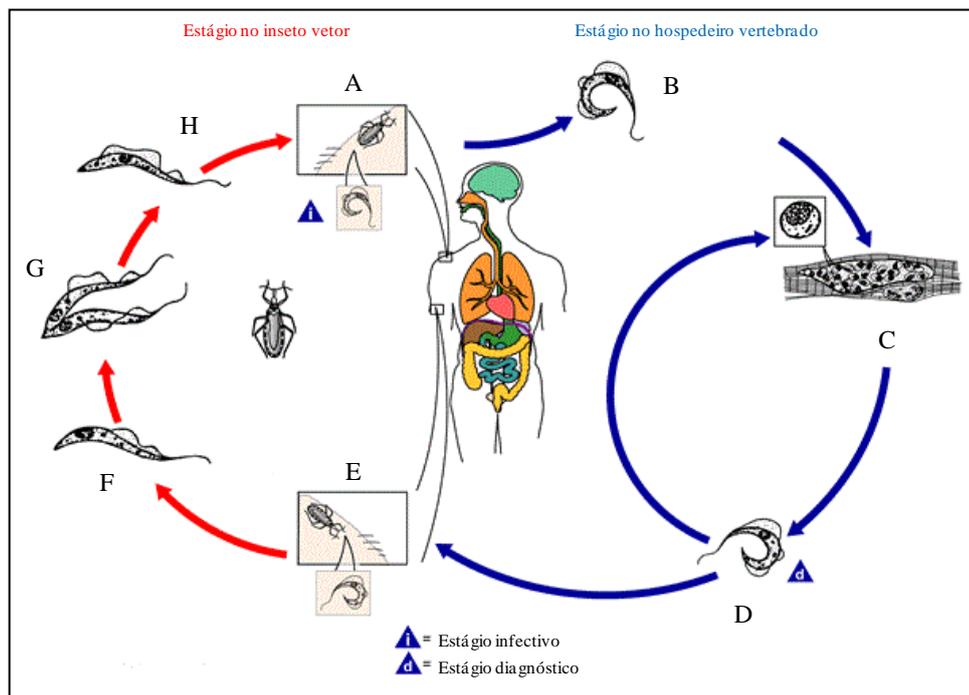


Figura 5: Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

A transfusão sanguínea de indivíduos infectados com o *T. cruzi* constitui o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas, sendo responsável por 5-20% dos casos relatados (Dias, 2000). Embora esta forma de transmissão tenha sido reduzida devido ao controle de vetores domiciliares e à melhora na triagem em bancos de sangue, ela ainda é de grande relevância principalmente nas grandes cidades, onde é alta a prevalência da infecção (de Lana e Tafuri, 2011).

Além das formas de transmissão já citadas, o *T. cruzi* também pode ser transmitido por via congênita através de mães infectadas (Muñoz et al., 2007; Bern et al., 2009), via oral através do aleitamento materno (Ferreira et al., 2003) ou da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas (Toso et al., 2011), por transplante de órgãos (Riarte et al., 1999; Kun et al.,

2009), acidentes de laboratório (Herwaldt, 2001; Kinoshita-Yanaga et al., 2009), dentre outras. O transplante de órgãos infectados pode desencadear a fase aguda grave, já que o transplantado é menos resistente à infecção devido ao uso de drogas imunossupressoras.

Embora a transmissão vetorial tenha maior importância epidemiológica, o sucesso na eliminação do principal inseto vetor da doença fez aumentar a relevância das demais formas de transmissão do *T. cruzi* (Dias e Amato Neto, 2011).

4.1.4 Imunidade

A infecção por *T. cruzi* mobiliza vários mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida, fazendo com que o parasito seja continuamente combatido e reduza sua multiplicação. Entretanto, tanto o parasito quanto a resposta imune persistem indefinidamente no hospedeiro e lesões teciduais resultantes dessa atividade imunológica prolongada acumulam-se, podendo participar da patogênese das diversas formas clínicas da doença (Castro, 2002; Sathler-Avelar et al., 2009). Assim, o equilíbrio entre a imunidade efetora e mecanismos regulatórios são determinantes da progressão da doença (de Araújo et al., 2011).

Durante a fase aguda há grande mobilização do sistema imune. O parasito promove a ativação inespecífica de macrófagos e de células *natural killer* (NK). Estas liberam a citocina IFN- γ , importante mediador da resistência à infecção, sendo responsável tanto pela ativação de macrófagos para destruírem os parasitos quanto pela indução da atividade Th1 imunoprotetora. Outras citocinas como TNF- α , IL-10 e IL-12 também participam da resposta imune na infecção e o equilíbrio entre elas determina o curso da infecção aguda na doença de Chagas e a progressão da doença (Tafuri, 1999; de Araújo et al., 2011; de Lana e Tafuri, 2011).

Posteriormente, ocorre a ativação dos linfócitos. Os linfócitos T CD4⁺ induzem a produção de anticorpos líticos e produzem citocinas como IFN- γ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasito. Já os linfócitos T CD8⁺ participam, principalmente, dos mecanismos de citólise. A ativação dos linfócitos B resulta na produção precoce de imunoglobulinas IgM e IgG (7-15 dias após infecção), que atingem níveis elevados concomitante ao aumento da parasitemia (Tafuri, 1999). Após a redução do número de parasitos, os níveis de IgM diminuem progressivamente até desaparecerem, enquanto os de IgG se estabilizam e podem ser facilmente detectáveis pelos testes sorológicos ao longo da

infecção, principalmente através de preparações antigênicas solúveis ou fixadas (Martins-Filho et al., 1995).

Na fase crônica da infecção, a imunidade mediada por anticorpos constitui um importante mecanismo de defesa contra o *T. cruzi*. Estudos evidenciam a existência de duas categorias de anticorpos no soro de pacientes cronicamente infectados: os anticorpos da sorologia convencional, subclasses IgG1 e IgG2, e os anticorpos líticos, subclasses IgG1 e IgG2, sendo estes responsáveis pela lise mediada por complemento (LMCo), que exerce papel fundamental na manutenção da parasitemia em níveis baixos devido à destruição dos parasitos intra e extracelulares (Krettli e Brener, 1982). Diferentemente dos anticorpos da sorologia convencional, os anticorpos líticos parecem desaparecer gradualmente após o tratamento e, por isso, métodos de diagnóstico foram padronizados para sua detecção objetivando, inclusive, determinar a cura de pacientes tratados (Martins-Filho et al., 1995; Martins-Filho et al., 2002).

4.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da doença de Chagas é altamente recomendado para que o tratamento seja realizado o quanto antes, visando a redução das graves consequências que a infecção pelo *T. cruzi* pode causar a longo prazo. Ele deve basear-se em uma combinação de resultados, incluindo a história clínica e epidemiológica, a detecção do parasito e a realização de ensaios sorológicos.

Os exames diagnósticos geralmente são realizados nas seguintes situações: em casos incomuns de pacientes sintomáticos ou com cardiopatia compatível à da doença, em imunossuprimidos com diagnóstico prévio, em mulheres grávidas, em recém-nascidos de mães já diagnosticadas, para a obtenção de prognóstico de pacientes já diagnosticados, para monitoração da efetividade do tratamento, e em exames de triagem realizados para doação/transfusão de sangue e transplante (Marcipar e Lagier, 2012).

O diagnóstico clínico é feito pela investigação da origem do paciente e da presença dos sinais e sintomas característicos da fase aguda ou das alterações cardíacas e digestivas que podem ocorrer na fase crônica. Entretanto, para confirmação diagnóstica, é necessária a realização de exames laboratoriais, que levam em consideração a fase da doença e o estado do hospedeiro (de Lana e Tafuri, 2011).

4.1.5.1 Diagnóstico laboratorial na doença de Chagas aguda

Como na fase aguda da doença a parasitemia é elevada e existem muitos anticorpos inespecíficos, com a formação ainda em fase inicial dos anticorpos específicos (IgM e IgG), técnicas sorológicas indiretas apresentam baixa sensibilidade, sendo recomendada a observação microscópica direta das tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue dos pacientes (especificidade de 100%) (Figura 6). Para isto, pode ser realizado o exame de sangue a fresco, o exame de sangue em gota espessa ou o esfregaço sanguíneo corado com Giemsa.

Existem também métodos de concentração do parasito que necessitam de menor volume de sangue para análise e geralmente são usados no diagnóstico da doença de Chagas congênita, como o exame do creme leucocitário e o teste de Strout. Outros exames parasitológicos, como a hemocultura e o xenodiagnóstico, também podem ser realizados e apresentam elevada taxa de positividade. No entanto, eles apresentam desvantagens como demora para liberação dos resultados e alto custo de manutenção das colônias de insetos, respectivamente (de Lana e Tafuri, 2011).

A pesquisa de anticorpos IgM por meio de métodos sorológicos como ELISA e RIFI também pode ser realizada, quando necessário, sempre levando em consideração o período de janela imunológica (Bern et al., 2008; Pereira e Navarro, 2013).

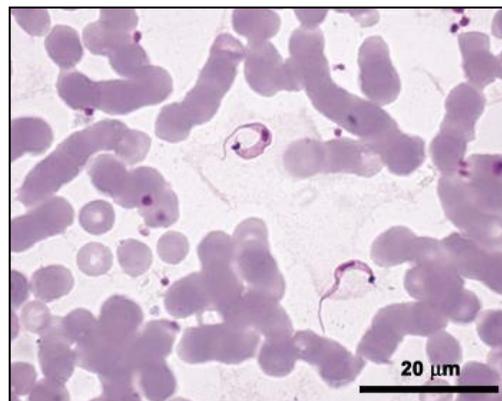


Figura 6: Tripomastigotas de *T. cruzi* em esfregaço sanguíneo. Fonte: Ministério da Saúde, 2005.

4.1.5.2 Diagnóstico laboratorial na doença de Chagas crônica

O diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença de Chagas é desafiante. Nesta fase a parasitemia é muito baixa, o que dificulta a detecção direta do parasito por meio dos métodos parasitológicos (sensibilidade de 20-50%), embora testes de xenodiagnóstico, hemocultivo ou PCR positivos sejam indicativos da doença (MS, 2010b). Por outro lado, a

resposta imune é significativa em indivíduos imunocompetentes, sendo por isto recomendado o diagnóstico através de métodos sorológicos, geralmente baseados na detecção de anticorpos específicos (IgG) anti-*T. cruzi* (MS, 2005; Pereira e Navarro, 2013). Os testes sorológicos mais empregados atualmente para o diagnóstico da doença de Chagas crônica estão descritos resumidamente abaixo.

A HAI é uma técnica de baixo custo, simples execução e interpretação, sendo utilizada há mais de 50 anos. Consiste na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígenos de *T. cruzi* na presença de soro contendo anticorpos para este parasito (Figura 7).

Estudo realizado pela OMS (2010b) com vários kits HAI para diagnóstico da doença de Chagas mostrou sensibilidade variando de 82,2-100% e especificidade de 53,7-100%. Assim, apesar da elevada positividade desta técnica (96 a 98%), ela tem apresentado resultados falso negativos, falhando ao deixar de detectar 1,6 a 2,5% de indivíduos infectados (Ferreira e Avila, 2001; OMS, 2002; Gadelha et al., 2003).

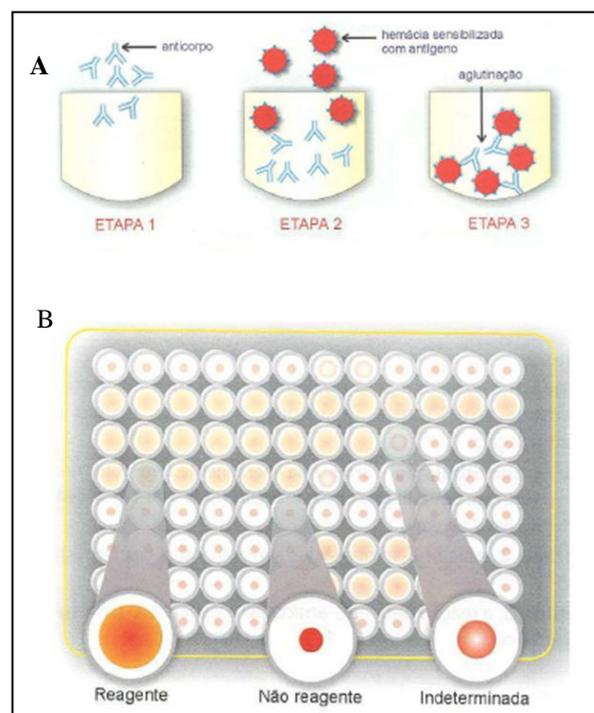


Figura 7: A: Representação esquemática da reação de HAI; B: Visualização de amostra reagente, não reagente e indeterminada. Fonte: Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/FIOCRUZ.

A RIFI foi desenvolvida na década de 1960 e é considerada o método de referência para o diagnóstico da doença de Chagas (sensibilidade em torno de 95%). Baseia-se na ligação dos antígenos de *T. cruzi* presentes em uma lâmina com os anticorpos do soro teste. O

uso de anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados a fluoresceína permite a observação do resultado positivo no microscópio de fluorescência (Figura 8).

A grande vantagem da RIFI é a alta sensibilidade, proporcionando títulos elevados de anticorpos nos soros dos indivíduos infectados. No entanto, esta metodologia necessita de microscópio de fluorescência e maior habilidade técnica para realização da análise, sendo subjetiva a leitura dos resultados nos casos com baixos níveis de anticorpos. Assim, para a obtenção de resultados confiáveis é preciso uma padronização rigorosa da microscopia de fluorescência e dos antígenos, da diluição do conjugado e do critério de leitura das lâminas (Ferreira e Avila, 2001).

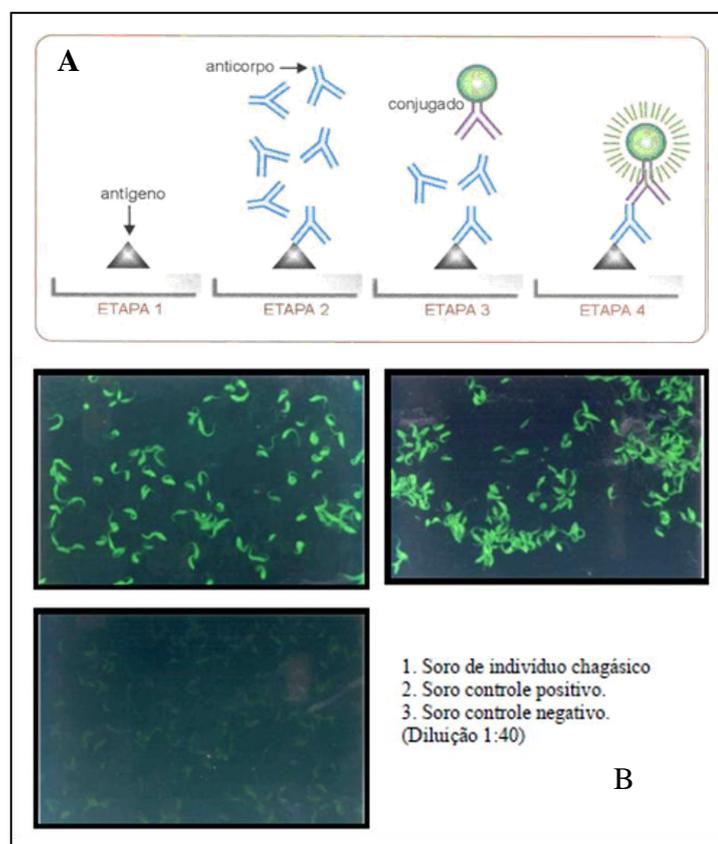


Figura 8: A: Representação esquemática da RIFI. B: Visualização do resultado no microscópio de fluorescência. Fonte: Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/FIOCRUZ.

O uso do ELISA para diagnóstico da doença de Chagas foi descrito em 1975, como um método de alta sensibilidade e que apresenta a vantagem de automatização da análise, permitindo a realização de exames em maior escala (Marcipar e Lagier, 2012). A técnica consiste em detectar anticorpos anti-*T. cruzi* através da utilização de anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados a enzimas, que em presença de substratos específicos geram produtos coloridos quantificados espectrofotometricamente (Figura 9).

Estudo realizado pela OMS (2010b) com vários kits ELISA para diagnóstico da doença de Chagas mostrou sensibilidade variando de 89,3-100% e especificidade de 93,6-100%. Um dos principais problemas do ELISA é a presença de reações falso-positivas, onde o valor da densidade óptica lida no espectrofotômetro fica muito próximo a linha de corte entre a amostra positiva e negativa. A fim de melhorar o desempenho desta metodologia, recentemente foi proposta a substituição dos antígenos naturais de *T. cruzi*, utilizados no ELISA convencional, por misturas de antígenos recombinantes, surgindo, assim, o ELISA recombinante (recELISA) (Meira et al., 2002; Reesink, 2005; Furuchó et al., 2008; Ferreira-Silva et al., 2010).

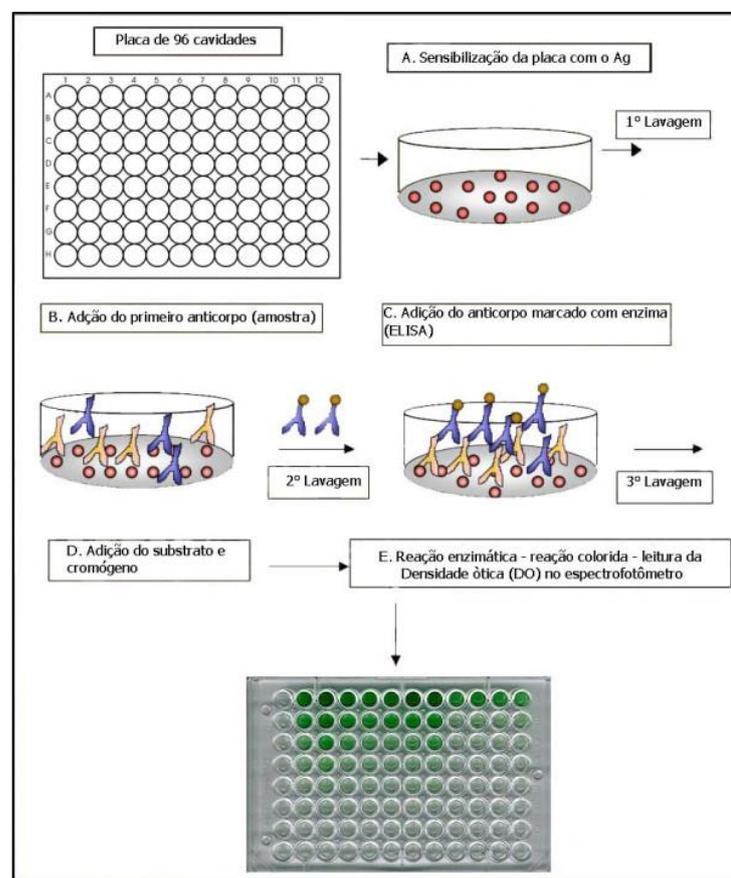


Figura 9: Representação esquemática do ELISA. Fonte: <http://diagnosticolaboratorial.com/2010/01/26/elisa/>

O Western Blot ou Imunoblot também pode ser utilizado para o diagnóstico da doença de Chagas e possui sensibilidade e especificidade de 100% (Furuchó et al., 2008). Nesta técnica, o antígeno de *T. cruzi* é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para separação das proteínas desnaturadas de acordo com sua massa molecular. Em seguida, o material fracionado no gel é transferido para uma membrana de nitrocelulose, os soros teste são adicionados e a reação antígeno-anticorpo é evidenciada pelo aparecimento de bandas

características (Figura 10). Um dos exemplos desta técnica é o teste comercial TESA-blot (trypomastigote excreted-secreted antigens-blot), que utiliza frações das formas infectantes do *T. cruzi* no formato de Immunoblotting e tem apresentado ótimo desempenho (Frade et al., 2011).

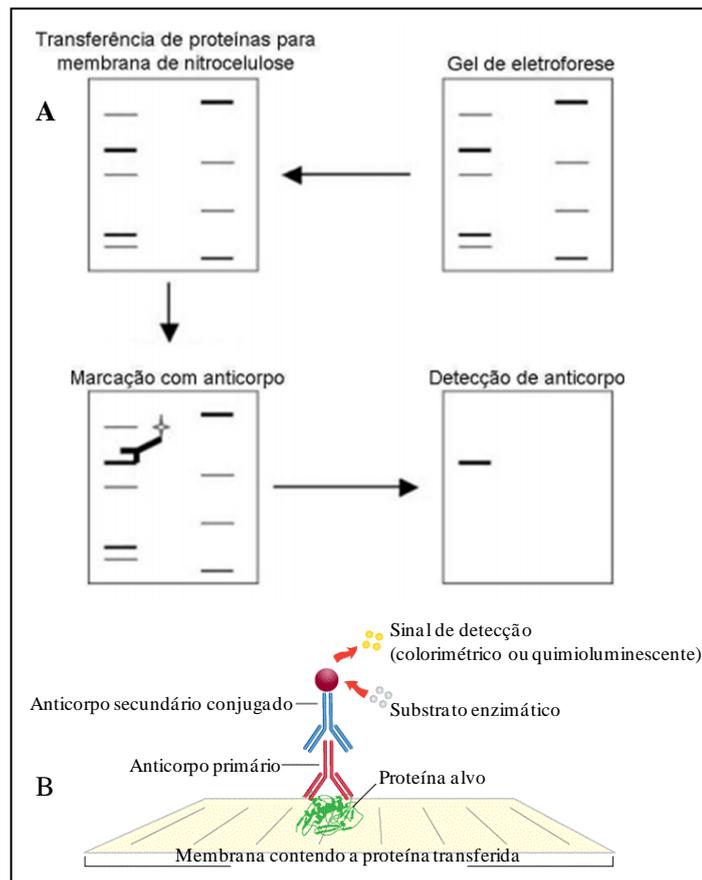


Figura 10: A: Representação esquemática do Western blot. B: Detalhe da etapa final: revelação da proteína.
Fonte: http://www.leinco.com/general_wb.

Mais recentemente, a introdução da citometria de fluxo por Martins-Filho et al. (1995) como um método sensível para a detecção de anticorpos, trouxe uma nova perspectiva para o diagnóstico da doença de Chagas. A citometria de fluxo é um método automatizado utilizado desde a década de 1950 para avaliar as propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas e/ou células que fluem numa suspensão líquida (Traganos, 1994) (Figura 11).

A imunofluorescência indireta por citometria de fluxo para detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi*, especificamente anti-antígenos de membrana de tripomastigotas vivas (FC-ALTA), tem apresentado resultados promissores não apenas para o diagnóstico, mas também para a avaliação da eficácia terapêutica na doença de Chagas. O método se mostrou mais sensível e apresentou maior precisão do que o teste de lise mediada por complemento

(LMCo), que detecta anticorpos líticos e tem sido indicado para discriminar indivíduos chagásicos tratados e curados após o tratamento específico (Martins-Filho et al., 2002; Vitelli-Avelar et al., 2007; Matos et al., 2011). Variações da técnica FC-ALTA têm sido desenvolvidas para aprimorar o diagnóstico da doença de Chagas e também para permitir seu uso no diagnóstico de uma ampla gama de doenças.

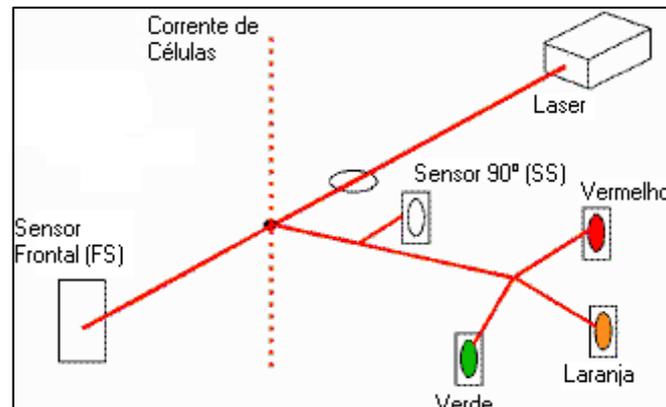


Figura 11: Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo.
Fonte: <http://www.labmed.pt/NotasTecnicas05.asp>.

Apesar do aprimoramento dos métodos disponíveis para diagnóstico da doença de Chagas crônica, ainda não há um teste sorológico considerado padrão-ouro (sensibilidade e especificidade de 100%). Os problemas dos métodos existentes no mercado estão relacionados à baixa sensibilidade, que pode levar a resultados falso-negativos, e principalmente à baixa especificidade, responsável por produzir resultados falso-positivos. Estes podem ocorrer devido à reatividade inespecífica com anticorpos produzidos durante o curso de doenças auto-imunes ou outras infecções, como as causadas por *T. rangeli* e *Leishmania* sp. (Saez-Alquezar et al., 2000).

Para a obtenção de resultados mais seguros no diagnóstico da doença de Chagas crônica, a OMS preconiza a realização de dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes: um que apresente elevada sensibilidade, como a RIFI ou o ELISA utilizando antígeno total ou frações semi-purificadas do *T. cruzi*, acompanhado de outro com elevada especificidade, como o teste ELISA utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi* (recELISA) (MS, 2010b; de Almeida e Santiliano, 2012).

No caso de resultados duvidosos, as reações devem ser repetidas e outras técnicas devem ser empregadas. Se dois métodos apresentarem resultados contraditórios, é recomendada a realização de um terceiro método de princípio diferente. Caso permaneça a dúvida, deve-se realizar um quarto método de imunodiagnóstico ou até um método não

imunológico. Assim, quando a sorologia é duvidosa ou se deseja verificar a eficácia do tratamento, métodos parasitológicos indiretos, como a PCR, podem ser necessários (de Lana e Tafuri, 2011; Marcipar e Lagier, 2012).

Um estudo recente comprovando a segurança e efetividade de alguns testes rápidos para diagnóstico da doença de Chagas pode fazer com que haja alterações na recomendação da OMS, fato que aumentaria a agilidade do diagnóstico em campo e, conseqüentemente, do tratamento aos infectados. O estudo foi realizado em laboratórios de diversos países e, na próxima etapa, pretende-se avaliar o desempenho dos mesmos testes rápidos em campo (Sánchez et al., 2014).

4.1.6 Reação cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Métodos sorológicos convencionais atualmente utilizados para diagnóstico e triagem da doença de Chagas e das leishmanioses – como DAT, HAI, RIFI e ELISA – apresentam várias limitações, dentre elas a alta frequência de resultados falso-positivos. Estes podem ocorrer devido à alta sensibilidade, à necessidade de grande quantidade de amostra por ensaio e, principalmente, aos altos índices de reatividade cruzada, sendo que a proximidade filogenética entre os agentes etiológicos da doença de Chagas (*T. cruzi*), da leishmaniose tegumentar (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*) e da leishmaniose visceral (*L. chagasi*) contribui, em grande parte, para este fenômeno (de Oliveira Filho, 2013).

Várias regiões do Brasil são co-endêmicas para estas doenças e o desequilíbrio ecológico em áreas endêmicas tem promovido um aumento considerável do número de casos desde 1993, sendo o perfil epidemiológico das leishmanioses de franca expansão urbana: a prevalência mundial gira em torno de 12 milhões de casos e a cada ano são registrados cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar e 500 mil novos casos de leishmaniose visceral (Gontijo e Melo, 2004; MS, 2010c).

Frente a este perfil epidemiológico e aos desafios encontrados pelos hemocentros e laboratórios clínicos, verifica-se a aplicabilidade e a demanda por métodos sorológicos alternativos para o diagnóstico específico e diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses. A falha das técnicas sorológicas no diagnóstico diferencial dessas doenças tem grande repercussão na determinação do diagnóstico, bem como na aplicação de medidas de monitoramento para os indivíduos identificados como soropositivos. Assim, isoladamente, um resultado positivo em sorologia convencional para doença de Chagas ou leishmaniose não

discrimina seguramente a presença destas doenças, contribuindo para altos índices de resultados falso-positivos.

Em associação aos métodos sorológicos convencionais, tem sido sugerido o uso de métodos moleculares para solucionar o problema da baixa especificidade do diagnóstico laboratorial dessas endemias (Marcon et al., 2011). No entanto, a implementação desses métodos em laboratórios clínicos de diagnóstico é dificultada por questões relativas à padronização da técnica de PCR em diferentes laboratórios, incluindo a escolha de alvos específicos do parasito e a sensibilidade diferencial inerente ao material biológico utilizado (pele, medula óssea ou sangue periférico), a reprodutibilidade e a infra-estrutura laboratorial necessária para a realização dos testes, a fim de evitar contaminação cruzada com produtos de amplificação pós-PCR.

4.2 Bancos de sangue

Os bancos de sangue ou hemocentros são responsáveis pelos procedimentos hemoterápicos, incluindo coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte, controle de qualidade e uso humano do sangue e seus componentes (MS, 2010a).

O Ministério da Saúde (MS) define as normas técnicas para todos os procedimentos realizados em bancos de sangue no Brasil através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e os doadores são selecionados em conformidade com as leis vigentes recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), observando-se as normas de segurança estabelecidas com base em vários estudos (Borelli et al., 2013). Porém, mesmo sendo realizada dentro das normas técnicas preconizadas, a transfusão sanguínea é um processo que envolve risco sanitário, com a ocorrência potencial de incidentes transfusionais, como a transmissão de doenças infecciosas e parasitárias (MS, 2004a).

Segundo o Ministério da Saúde (2010a), existem no Brasil 27 hemocentros que gerenciam dezenas de unidades de triagem para sangue, hemoderivados, órgãos e células, além de 42 centros de transplante de tecidos e centenas de laboratórios de análises clínicas privados que rotineiramente executam testes diagnósticos para doença de Chagas e leishmanioses. No entanto, ainda não existem métodos de referência que permitam o esclarecimento diagnóstico de situações inconclusivas na triagem sorológica em Bancos de Sangue, sendo que tal situação também é um problema para os laboratórios clínicos que realizam sorologia para estas doenças.

4.2.1 História

Desde a pré-história há registros de tentativas de se usar o sangue para curar doenças. Porém, as primeiras transfusões ocorreram apenas no século XVII e eram quase sempre feitas com sangue de animais. Assim, a história da transfusão é classicamente dividida em três períodos: a era pré-histórica, o período pré-científico, que teve início no século XVII com a descoberta da circulação sanguínea pelo médico britânico William Harvey, e o período científico, que teve início em 1900 com a descoberta do grupo sanguíneo ABO pelo pesquisador austríaco Landsteiner, possibilitando a utilização do sangue como agente terapêutico (HEMOMINAS, 2014).

Devido à falta de soluções anticoagulantes que permitissem a estocagem do sangue coletado de doadores, a transfusão era feita “braço a braço”. Em 1917, a solução anticoagulante à base de citrato de sódio foi desenvolvida, permitindo o início do processo de armazenamento e de estocagem do sangue. Nos anos de 1939 e 1941, Landsteiner, Wiener e Levine descreveram o Fator Rh, que constituiu uma base sólida para a compatibilidade da transfusão de sangue e de seus componentes (HEMOMINAS, 2014).

O primeiro Centro de Hematologia e Transfusão de Sangue surgiu em 1926, em Moscou, e, na década de 1930, a transfusão já havia se tornado rotina na prática médica, com a instalação de centros por todo o mundo. No Brasil, vários bancos de sangue públicos e privados foram inaugurados na década de 1940 e a hemoterapia começou a ser vista como especialidade médica. No entanto, o sistema transfusional brasileiro baseava-se na doação remunerada e sem critérios, favorecendo o recrutamento de pessoas doentes, alcoólatras, indigentes e anêmicas (HEMOMINAS, 2014).

Em 1964 foi instituída a Comissão Nacional de Hemoterapia (CNH), que resultou na criação de lei sobre o exercício da atividade hemoterápica no Brasil e deu as bases da Política Nacional do Sangue. Em 1976, a CNH passou a constituir a Câmara Técnica de Hemoterapia, órgão permanente do Ministério da Saúde com funções normativas e consultivas (MS, 2004a).

Em 1980 foi criado o Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados (Pró-Sangue) (MS, 1980) com a finalidade de regularizar a situação da hemoterapia brasileira. Em seguida, surgiram os Centros de Hematologia e Hemoterapia – os hemocentros, com o desafio de implantar a doação sistemática e voluntária de sangue, colocando fim à doação remunerada (Almeida et al., 2009).

Com o advento da AIDS e o elevado número de casos de contaminação pelo HIV por meio de transfusão – até 1987 foi responsável por 8,8% dos casos notificados ao Ministério da

Saúde – foram estabelecidas medidas rigorosas a fim de oferecer maior segurança aos doadores e receptores. Assim, foi proibida toda e qualquer forma de comercialização do sangue ou de seus derivados, conforme o artigo 199 incluído na Constituição de 1988 (Dias e Schofield, 1998).

O progresso da transfusão sanguínea, com as várias descobertas, o aperfeiçoamento de técnicas e equipamentos, a aplicação de estratégias regulamentadoras e a incorporação de conhecimentos clínico-epidemiológicos e laboratoriais para triagem dos doadores, permitiu que esta prática se tornasse complexa e sofisticada. Consequentemente, houve redução significativa do risco da transmissão transfusional de doenças (MS, 2004a).

Atualmente no Brasil, os serviços de hemoterapia são regidos pelas normas técnicas contidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 57, de 16 de dezembro de 2010 e pelo Decreto 1353 do Ministério da Saúde, de 13 de junho de 2011 (MS, 2010a; MS, 2011).

4.2.2 Requisitos básicos e impedimentos para doação de sangue

Visando oferecer segurança e proteção aos doadores e receptores, os hemocentros obedecem com rigor normas nacionais e internacionais estabelecidas para a triagem de doadores de sangue. As estratégias de controle da transmissão transfusional de doenças envolvem essencialmente a seleção dos doadores de sangue e a melhora na qualidade dos testes empregados na triagem sorológica (HEMOMINAS, 2014; HEMOPE, 2014; PRÓ-SANGUE, 2014).

Segundo dados da Fundação PRÓ-SANGUE, de cada 10 candidatos à doação de sangue que comparecem à instituição, 8 estão aptos para doar e dois estão temporária ou definitivamente inaptos. Abaixo estão listados os requisitos básicos e alguns dos principais impedimentos temporários e definitivos para doação de sangue (HEMOMINAS, 2014; HEMOPE, 2014; PRÓ-SANGUE, 2014).

- Requisitos básicos: apresentar documento de identificação; ter entre 16 e 69 anos; pesar no mínimo 50kg; estar em boas condições de saúde, descansado e alimentado, além de não apresentar vulnerabilidade para a transmissão de doenças veiculadas pelo sangue.

- Impedimentos temporários: resfriado; gravidez e resguardo; amamentação; ingestão de bebida alcoólica nas últimas 12 horas; realização de tatuagem ou colocação de piercing nos últimos 12 meses; exposição a situações de maior risco de adquirir doenças sexualmente transmissíveis; viagem recente para estados com alta prevalência de malária.

- Impedimentos definitivos: uso de drogas ilícitas injetáveis; evidência clínica ou laboratorial de Hepatites, AIDS (vírus HIV), doenças associadas aos vírus HTLV I e II, malária e doença de Chagas. O antecedente epidemiológico de contato domiciliar com triatomíneos representa inaptidão definitiva para doação de sangue.

4.2.3 Etapas da doação de sangue/ciclo do sangue

A primeira etapa da doação de sangue consiste na captação de potenciais doadores em bom estado de saúde por meio da mídia motivacional e de outras técnicas de recrutamento. Esta etapa é fundamental para sensibilizar a população, de forma que haja suporte hemoterápico suficiente e de boa qualidade sempre disponível (MS, 2004a). De acordo com o Ministério da Saúde (2011), um percentual entre 3% e 5% de doadores entre a população geral é considerado seguro para repor o estoque de sangue. Na maioria dos estados, porém, esta porcentagem de doadores é bem menor.

Após o cadastro, é feita a triagem clínica rigorosa do doador, com avaliação física e epidemiológica, sendo as informações prestadas consideradas para definir se o candidato atende aos critérios desejáveis para doar sangue no momento (HEMOMINAS, 2014; HEMOPE, 2014; PRÓ-SANGUE, 2014).

O candidato considerado apto à doação passa, então, pela coleta de aproximadamente 450mL sangue total em bolsa e em tubos estéreis descartáveis. Posteriormente, é realizado o voto de auto-exclusão, que é confidencial e dá a última oportunidade ao doador que omitiu uma condição de risco acrescido durante a entrevista, de determinar o descarte da bolsa coletada para que ela não seja transfundida. Após alimentação e hidratação, o doador é liberado (MS, 2004a).

Caso o voto de auto-exclusão seja negativo, o sangue total contido na bolsa é encaminhado ao fracionamento, onde pode ser separado para obtenção dos hemocomponentes por meio de centrifugação. Estes são utilizados na transfusão conforme a necessidade do paciente: concentrado de hemácias (utilizado em casos de anemia aguda), concentrado de plaquetas (utilizado na prevenção e tratamento de hemorragias), plasma (utilizado no tratamento de sangramentos e na deficiência de vários fatores da coagulação) e crioprecipitado (utilizado em pacientes com deficiência de fatores da coagulação). O concentrado de granulócitos é obtido mediante coleta seletiva por aférese e utilizado em infecções graves. A partir do fracionamento do plasma sanguíneo por processos físico-químicos, é possível preparar também os hemoderivados (concentrados de fatores de

coagulação, albumina e globulinas), geralmente produzidos em escala industrial (HEMOMINAS, 2014; HEMOPE, 2014; PRÓ-SANGUE, 2014).

Já os tubos contendo sangue total são encaminhados ao laboratório, onde são realizados exames imunohematológicos (tipagem ABO e Rh, pesquisa de anticorpos irregulares e de hemoglobina S) e, após processamento para obtenção dos soros, exames sorológicos de alta sensibilidade para seis doenças infecciosas: hepatite B, hepatite C, infecção pelo HIV, infecção pelo HTLV-I/II, sífilis e doença de Chagas. Em regiões endêmicas para malária é realizado também o exame parasitológico do sangue e, em casos especiais, a sorologia para infecção pelo citomegalovírus (MS, 2004a).

Os hemocomponentes são transferidos para o estoque, onde são armazenadas em local especial e temperatura adequada para conservação, ficando em quarentena até a liberação dos resultados dos exames. Se um dos testes apresentar resultado alterado, o hemocomponente impróprio é descartado e o doador é convocado a retornar ao hemocentro para coleta de nova amostra, repetição dos exames e orientação médica caso a alteração persista (MS, 2004a).

Os hemocomponentes aprovados para consumo ficam à disposição dos pacientes e instituições de saúde até o prazo de validade, variável para cada hemocomponente. Estes podem ser utilizados após prescrição médica e realização dos exames pré-transfusionais para verificar a compatibilidade sanguínea entre doador e receptor. Quando indicado, pode ser realizada a lavagem, filtração ou irradiação do hemocomponente a ser transfundido (HEMOMINAS, 2014; HEMOPE, 2014; PRÓ-SANGUE, 2014).

O fluxograma do ciclo do sangue é apresentado na Figura 12.

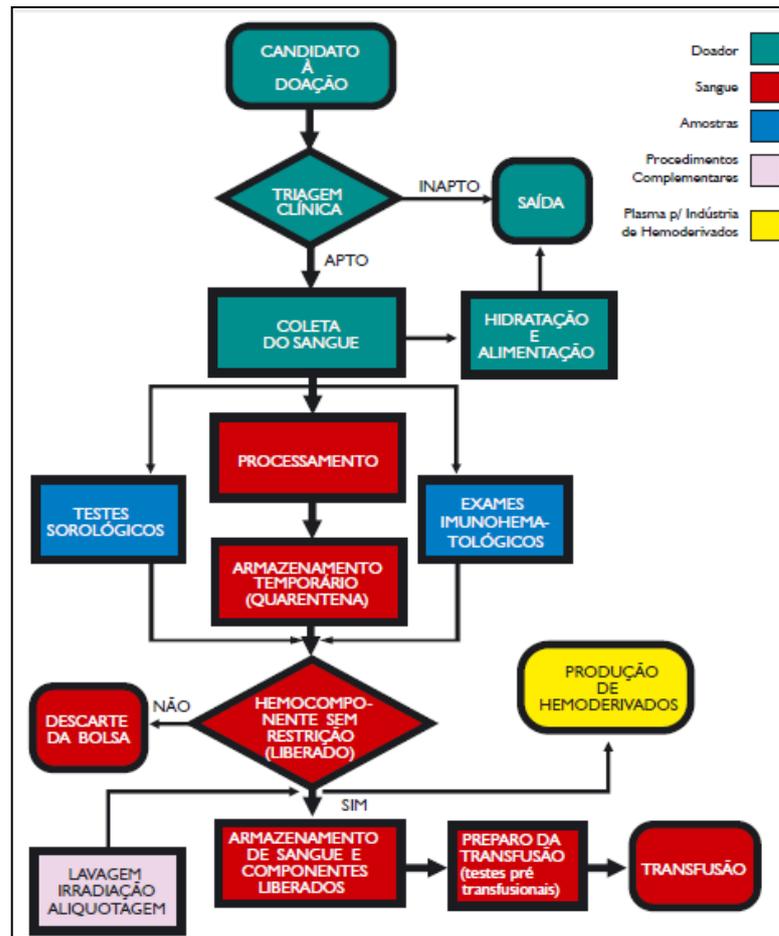


Figura 12: Fluxograma do ciclo do sangue. Fonte: Ministério da Saúde, 2004.

Estudos sobre o perfil dos doadores de sangue no Brasil têm mostrado que a maioria, cerca de 66%, é do sexo masculino, aproximadamente 39% são doadores de reposição e a média de doações por ano é de cerca de 1,49, considerando o mesmo doador (Carneiro-Proietti et al., 2010). Gonzalez et al. (2013) encontraram uma taxa de inaptidão para a doação por qualquer razão de 22,5%, considerando os hemocentros de Belo Horizonte (27%), Recife (23%) e São Paulo (19%).

4.2.4 Triagem sorológica para doença de Chagas em hemocentros

A hipótese da transmissão da doença de Chagas via transfusão sanguínea foi levantada em 1936 (Mazza et al., 1936) na Argentina e comprovada no Brasil no ano de 1952 (Freitas et al., 1952). Os altos índices migratórios na década de 1950 promoveram a urbanização da doença no Brasil e, conseqüentemente, a alta prevalência (cerca de 10%) de doadores

chagásicos nos bancos de sangue (OMS, 2002), sendo que em 1969, a transmissão da infecção por via transfusional tinha incidência estimada em 10,000 novos casos/ano (Moraes-Souza e Bordin, 1996).

No entanto, a implementação, em 1970, do programa para erradicar a transmissão vetorial do *T. cruzi* em domicílios brasileiros, somada à obrigatoriedade da triagem sorológica para a doença de Chagas em hemocentros brasileiros desde 1969, fizeram com que houvesse declínio nas taxas de soroprevalência entre doadores e uma progressiva redução do risco da transmissão transfusional da doença de Chagas (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). Assim, o panorama da transmissão transfusional da infecção pelo *T. cruzi* no Brasil tem melhorado significativamente: na década de 1970, a prevalência da infecção chagásica entre doadores de sangue alcançou 11,08%; na década de 1980 esta taxa caiu para 7,03%; em 1992 foi de 1%; em 2000 foi de 0,73% e em 2010 chegou a 0,17% (OPAS, 2006; MS, 2011).

Na América do Sul, as investigações sorológicas realizadas em doadores de sangue têm revelado uma taxa variável de 0,2 - 28% de soropositividade para *T. cruzi* (Kirchhoff et al., 2006). Estudo realizado pela OPAS (1994) encontrou 0,44% de prevalência sorológica entre doadores de sangue no Brasil entre os anos de 1990 e 1991, sendo que na Bolívia a prevalência encontrada foi de 25%. No México, a soroprevalência foi estimada em 1,6% (Martínez-Tovar et al., 2014) e na Colômbia em 0,49% (Gómez et al., 2014), sendo maior a frequência de doadores positivos para doença de Chagas em homens com idade entre 37 e 40 anos em ambos os estudos.

De fato, estudos realizados com doadores de sangue têm mostrado uma dramática diminuição da prevalência da infecção por *T. cruzi* com a idade (MS, 2004a). Após análise de 94 mil amostras de sangue de crianças entre 0 a 5 anos em 2007, Moncayo e Silveira (2009) demonstraram uma soroprevalência da doença de Chagas de 0% neste grupo. No estudo realizado por Sabino et al. (2010), os doadores soropositivos para doença de Chagas estavam situados entre faixas etárias mais elevadas e a prevalência de confirmados positivos entre os doadores abaixo de 25 anos de idade foi 75 vezes menor do que a observada em doadores mais idosos (15/100,000 vs. 756/100,000). Segundo os autores, a aquisição de nova infecção pelo *T. cruzi* no Brasil é rara, sendo, portanto, muito baixo o risco da transmissão por transfusão sanguínea ocorrer devido à fase de janela imunológica, em que as infecções recentes não são detectadas pelos métodos sorológicos de triagem.

No Brasil, a sorologia não negativa (positiva ou indeterminada) para *T. cruzi* entre os doadores de sangue passou de 6,9% para 0,2% em aproximadamente 30 anos (OPAS, 2006). Esta queda pode ser explicada pelo sucesso no controle vetorial aliado à melhora técnico-

científica, às ações de vigilância sanitária e à melhoria na qualidade do sangue transfundido no país. Além disso, a crescente urbanização da população brasileira fez com que os doadores mais jovens não vivessem em ambientes rurais, onde há maior risco de exposição ao *T. cruzi* (Sabino et al., 2010; Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011).

O risco de um paciente se infectar ao receber uma unidade de sangue de doador chagásico oscila entre 12% e 18% (Leiby et al., 1999). Este risco depende dos seguintes fatores: presença do parasito no sangue ou componente transfundido; tipo e número do produto sanguíneo infectado transfundido; estado imunológico do receptor; nível de cobertura sorológica dos doadores e sensibilidade dos testes sorológicos empregados na seleção dos doadores (Schofield et al., 2006).

A regulamentação técnica da atividade hemoterápica no Brasil, presente na RDC 153 de 2004, determina que todo doador de sangue deve ser submetido a uma triagem clínico-epidemiológica e laboratorial, visando maior segurança transfusional. Como a cobertura sorológica no país é universal, o risco da transmissão transfusional se restringe aos raros casos de falha de sensibilidade dos testes sorológicos (sensibilidade hoje superior a 99,5%) e a eventuais erros no processo (MS, 2004a; Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). Um amplo estudo realizado no final dos anos 90 em hemocentros públicos e privados brasileiros demonstrou falha de 1,6% na identificação da infecção por *T. cruzi* (falso-negativos) (Moraes-Souza e Bordin, 1996).

A triagem consiste na realização de testes, exames ou outros procedimentos com o objetivo de diagnosticar de forma presuntiva determinado agravo e/ou doença em pessoas aparentemente saudáveis. O teste utilizado em um programa de triagem deve ser rápido, barato e de fácil execução. Além disso, outras características devem ser consideradas, como sua precisão, acurácia, repetibilidade, sensibilidade e especificidade (MS, 2004a).

A sensibilidade é a probabilidade do teste apresentar resultado positivo dado que o indivíduo é portador da doença, condição ou agravo. Assim, um teste com alta sensibilidade raramente deixa de reagir quando amostras de indivíduos com a doença são testadas. Conseqüentemente, o número de exames falso-negativos é baixo, daí sua importância para a triagem de doadores de sangue (MS, 2004a).

Por outro lado, a especificidade é a probabilidade do teste apresentar resultado negativo dado que o indivíduo não é portador da doença, condição ou agravo. Assim, um teste com alta especificidade raramente reagirá quando amostras de indivíduos sadios são testadas. Conseqüentemente, o número de exames falso-positivos é baixo, daí sua importância para a confirmação diagnóstica de doenças (MS, 2004a).

Sensibilidade e especificidade são propriedades do teste, enquanto valores preditivos positivos e negativos são propriedades tanto do teste quanto da população, pois dependem da prevalência da doença. Assim, valor preditivo positivo é a fração de pessoas com testes positivos que realmente têm a doença e valor preditivo negativo é a fração de pessoas com testes negativos que realmente não têm a doença.

Até 2004, os bancos de sangue eram instruídos a realizar dois testes diferentes para triagem sorológica da doença de Chagas em doadores de sangue, um para detecção de anticorpos IgM e outro para detecção de anticorpos IgG. No entanto, muitos resultados se apresentavam discordantes entre os métodos e, atualmente, a recomendação é de que a triagem seja realizada utilizando apenas um teste imunoenzimático de elevada sensibilidade (MS, 2004b).

Assim, as amostras de soro ou plasma dos candidatos à doação de sangue são submetidas ao ELISA. Se o resultado for não-reativo (negativo), o indivíduo é considerado doador e sua bolsa de sangue é liberada para uso. O Ministério da Saúde (2004a) recomenda que, caso o resultado seja reativo (positivo) ou indeterminado (zona cinza), o ELISA seja repetido duas vezes utilizando a mesma amostra. Se o resultado de ambos os testes for não-reativo, a bolsa é liberada para uso e as causas da reação falso positiva no primeiro teste são investigadas. Entretanto, continuando o resultado reativo ou indeterminado em um ou nos dois testes, a bolsa de sangue é descartada e o doador é convocado a comparecer novamente ao hemocentro.

O algoritmo da Figura 13 se aplica aos testes realizados para triagem de diversas doenças em bancos de sangue, dentre elas a doença de Chagas.

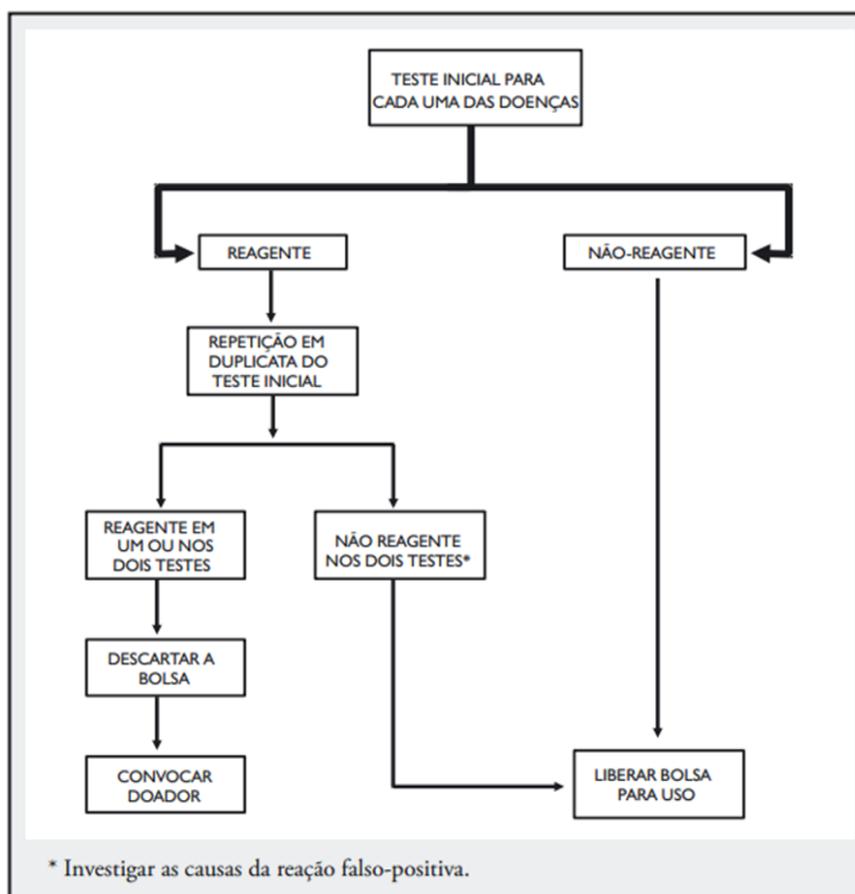


Figura 13: Algoritmo para testagem e liberação de bolsas de sangue na triagem sorológica para doença de Chagas em hemocentros. Fonte: Ministério da Saúde, 2004.

Segundo o Ministério da Saúde (2004b), para confirmação de um resultado não negativo na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue, deve ser realizado na mesma amostra um segundo teste de detecção de anticorpo com reagente de outra origem ou de outro fabricante ou com outra metodologia. Caso o segundo teste seja não negativo, o serviço de hemoterapia deve convocar o doador para coleta de uma nova amostra e repetir os exames com resultado reativo ou indeterminado. Se estes exames confirmarem a não negatividade dos resultados, a bolsa de sangue deve ser descartada de forma definitiva e o doador deve ser convocado e encaminhado aos serviços assistenciais.

De acordo com a legislação vigente, a confirmação do diagnóstico dos indivíduos com resultados reativos ou duvidosos na triagem sorológica para doença de Chagas é facultativa nos bancos de sangue e, caso estes não a façam, o serviço de hemoterapia deverá convocar o doador, prestando adequado atendimento e dando as orientações necessárias. Este deve ser

encaminhado a um serviço de referência ou serviço social de assistência ao doador para a realização dos exames necessários, onde são realizados os testes mais específicos para confirmação do diagnóstico e o tratamento, quando for o caso.

4.3 Metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1)

A metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1) é um teste confirmatório de elevada sensibilidade e especificidade que utiliza a citometria de fluxo para verificar a reatividade diferencial de anticorpos anti-tripanosomatídeos, o que permite o esclarecimento diagnóstico da doença de Chagas e das leishmanioses. Ela foi desenvolvida e padronizada no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ).

4.3.1 Histórico do desenvolvimento

A citometria de fluxo tem sido utilizada como uma importante ferramenta para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*, com comprovada aplicação no campo da pesquisa laboratorial. Além de sua elevada sensibilidade, a capacidade de detectar 10.000 parasitos fluorescentes por ensaio e de utilizar parasitos inteiros como fonte de antígenos aumentaram a importância desta técnica em relação às outras (Cordeiro et al., 2001). Uma série de trabalhos forneceram dados substanciais que estimularam a otimização adicional desta ferramenta para o diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses, por meio da detecção de anticorpos anti-tripanosomatídeos vivos ou fixados (Martins-Filho et al., 1995; Martins-Filho et al., 2002; Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2003; Rocha et al., 2006; Vitelli-Avelar et al., 2007; Pissinate et al., 2008; Garcia et al., 2009).

Assim, com o intuito de aprimorar as metodologias sorológicas empregadas em estudos na doença de Chagas, no ano de 1993 foi proposto o desenvolvimento tecnológico de uma nova metodologia, baseada na citometria de fluxo, para pesquisa de anticorpos denominados não convencionais, anti-formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* (FC-ALTA), em contraposição aos anticorpos convencionais anti-antígenos de formas epimastigotas do *T. cruzi*. Esse trabalho representou um marco na utilização da citometria de fluxo em sorologia, trazendo novas perspectivas para o diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas (Martins-Filho et al., 1995).

No ano de 2002, a nova metodologia para diagnóstico da doença de Chagas foi validada por meio de um estudo duplo cego empregando amostras codificadas, confirmando assim sua aplicabilidade para investigar e monitorar a cura pós-terapêutica da doença de Chagas (Martins-Filho et al., 2002). Entretanto, apesar do bom desempenho, houve algumas limitações metodológicas relacionadas à obtenção das formas tripomastigotas utilizadas como antígeno, ao caráter lábil da preparação antigênica e ao risco inerente à manipulação de formas infectantes do parasito. Dessa forma, o desafio tecnológico foi adaptar a metodologia para a pesquisa de anticorpos anti-formas epimastigotas do *T. cruzi* pré-fixadas em paraformaldeído.

Ciente da importância da estabilidade e da ampliação do prazo de validade das preparações antigênicas usadas em métodos diagnósticos, em 2007 foram incorporadas novas ferramentas ao estudo sorológico da doença de Chagas por citometria de fluxo, com a utilização de formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* num ensaio com diluições seriadas da amostra teste. Utilizando ferramentas de análise de desempenho, verificou-se que a mudança proporcionou maior qualidade, reprodutibilidade e refinamento metodológico no cumprimento de critérios de validação de métodos.

Assim, no ano de 2007, foi desenvolvida no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM), a metodologia denominada “Pesquisa de imunoglobulinas G anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* (FC-AFEA-IgG)” com aplicação no diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, apresentando alta sensibilidade e moderada especificidade (Vitelli-Avelar et al., 2007). A reatividade cruzada com amostras de soros de pacientes portadores de leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar foi a principal responsável pela moderada especificidade da técnica FC-AFEA no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Em 2008, com a nova sorologia para doença de Chagas já consolidada, o modelo de pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo foi ampliado para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar, empregando formas promastigotas fixadas de *L. amazonensis* (FC-AFPA) (Pissinate et al., 2008). Em 2009, o método foi adaptado para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, empregando formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* (FC-AFPA-IgG), e apresentou excelente desempenho com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (Lemos et al., 2007; Garcia et al., 2009).

Apesar de inovadoras, com o uso de preparações antigênicas pré-fixadas e a citometria de fluxo como instrumento de inovação tecnológica para análise da reatividade sorológica, as três metodologias desenvolvidas apresentavam restrições de desempenho relacionadas à

reatividade cruzada entre amostras de soros de pacientes portadores de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Assim, embora da FC-AFPA-IgG utilizando *L. chagasi* apresentasse um excelente desempenho no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, a FC-AFEA empregando *T. cruzi* e a FC-AFPA empregando *L. amazonensis* apresentaram reatividade cruzada quando utilizadas, respectivamente, para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas e da leishmaniose tegumentar.

Visando superar essas limitações, foi proposto o estabelecimento da “Metodologia TRIPLEX” (FC-TRIPLEX-IgG1), que combina simultaneamente as metodologias FC-AFEA-*T. cruzi*, FC-AFPA-*L. amazonensis* e FC-AFPA-*L. chagasi* para pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo em plataforma única.

O primeiro desafio a ser superado foi desenvolver um sistema de análise seletiva das formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania* spp., considerando que a similaridade dos aspectos morfológicos desses parasitos impede a seleção adequada de cada um deles empregando apenas parâmetros de tamanho e granulosidade. A solução foi realizar a marcação gradativa de cada população de parasitos com fluorescência 1 (FL- 1) empregando isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou fluorescência 4 (FL- 4) empregando Alexa Fluor647, sendo o sistema de fluorescência utilizado distinto do empregado para revelação da reatividade sorológica de IgG1 após incubação dos parasitos com o soro humano.

Além disso, foram realizados alguns aprimoramentos metodológicos na FC-TRIPLEX-IgG1. Primeiramente, a pesquisa seletiva da subclasse de anticorpos IgG1 passou a ser realizada (Cordeiro et al., 2001), visto que estudos prévios identificaram a pesquisa de IgG total como responsável por parte dos problemas relativos à baixa especificidade dos métodos diagnósticos sorológicos, com ocorrência de reações inespecíficas. Adicionalmente, o sistema de revelação convencional, que emprega reagentes secundários diretamente conjugados com fluorocromos, foi substituído por um sistema de amplificação que utiliza o complexo biotina-estreptavidina, aumentando a sensibilidade do método.

A metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 também passou a utilizar um algoritmo de análise dessincronizada sequencial da reatividade sorológica de IgG1 em diluições previamente selecionadas, já que a utilização de diluições seriadas da amostra-teste garante a alta especificidade em altas diluições sem perda da sensibilidade em diluições menores, o que reduz consideravelmente a reatividade cruzada.

Por fim, dados recentes da literatura mostraram que o uso de formas promastigotas de *L. braziliensis* em preparações antigênicas para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar geralmente oferece melhor desempenho em comparação com *L. amazonensis*.

Sendo assim, foi feita a substituição da espécie de parasito utilizado, objetivando aumentar a sensibilidade metodológica (Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2003; Rocha et al., 2006; Pereira et al., 2012).

Após todas as mudanças e ajustes metodológicos, foi realizado um estudo piloto da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 utilizando uma bateria de soros padrões de indivíduos controles negativos e pacientes portadores de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Os resultados obtidos foram altamente promissores e o FC-TRIPLEX-IgG1 demonstrou possuir excelente desempenho no diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses, com 95% de resultados corretos (Teixeira-Carvalho et al., 2014).

4.3.2 Padronização

Para a padronização do método FC-TRIPLEX-IgG1 foram selecionadas amostras de indivíduos não infectados (NI), de portadores de doença de Chagas (CH), de indivíduos tratados e curados para doença de Chagas, de portadores de leishmaniose tegumentar (LT), de indivíduos tratados e curados para LT, de portadores de leishmaniose visceral e de indivíduos tratados e curados para LV. As amostras empregadas eram provenientes da soroteca da FIOCRUZ e da soroteca da Fundação PRÓ-SANGUE de São Paulo.

Foram avaliadas várias soluções tamponantes, diferentes condições de cultivo dos parasitos, de diluição dos soros e reagentes, de incubação e de processos de lavagem para permitir um desempenho máximo na detecção de anticorpos específicos. A avidéz específica e a isotipagem da resposta de anticorpos para os antígenos testados foram avaliadas durante a otimização do ensaio. Foram também avaliados diferentes sistemas de amplificação de sinal fluorescente para encontrar o que possibilitou a máxima sensibilidade do método, algoritmos computacionais para captura e análise dos dados e o software para auxiliar a interpretação dos resultados.

Por meio do programa estatístico MedCalc Statistical, foi obtida a *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para avaliação da acurácia global da metodologia e seleção do ponto de corte/limiar do teste, o que é realizado através da comparação dos resultados de um grupo de pacientes com os de um grupo controle bem caracterizado. Caso seja definido um ponto de corte muito elevado, o teste terá poucos resultados falso-positivos, mas muitos falso-negativos (baixa sensibilidade). Por outro lado, caso seja definido um ponto de corte muito baixo, a maioria dos indivíduos com a doença serão identificados, mas haverá muitos resultados falso-positivos (baixa especificidade).

Assim, a curva ROC é uma ferramenta para auxiliar na visualização do equilíbrio entre alta sensibilidade e alta especificidade e a definição do ponto de corte considera os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos, falso-positivos e falso-negativos (Metz, 1978).

A metodologia foi padronizada e sua execução ocorre dentro das normas de boas práticas laboratoriais e das normas de qualidade da FIOCRUZ. Os parâmetros de desempenho, como sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razão de verossimilhança foram caracterizados e os resultados encontrados abriram grandes perspectivas do ponto de vista da aplicabilidade da técnica na rotina dos serviços de saúde, principalmente nos bancos de sangue, que tem por finalidade garantir a qualidade do sangue e hemoderivados utilizados em hemoterapia (Vitelli-Avelar et al., 2007).

4.3.3 Estudos pilotos

Os resultados de um estudo piloto, repetido e confirmado, utilizando 77 amostras de soros bem caracterizadas, tripanosomatídeos marcados com concentrações gradativas de FITC (FL-1) e um sistema de revelação da reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos com Alexa Fúor647 (FL-4), mostraram um excelente desempenho da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1.

No primeiro lote de parasitos foram observados 96,1% (74/77) de resultados corretos, com 3 resultados falso-negativos para leishmaniose tegumentar (Figura 14).

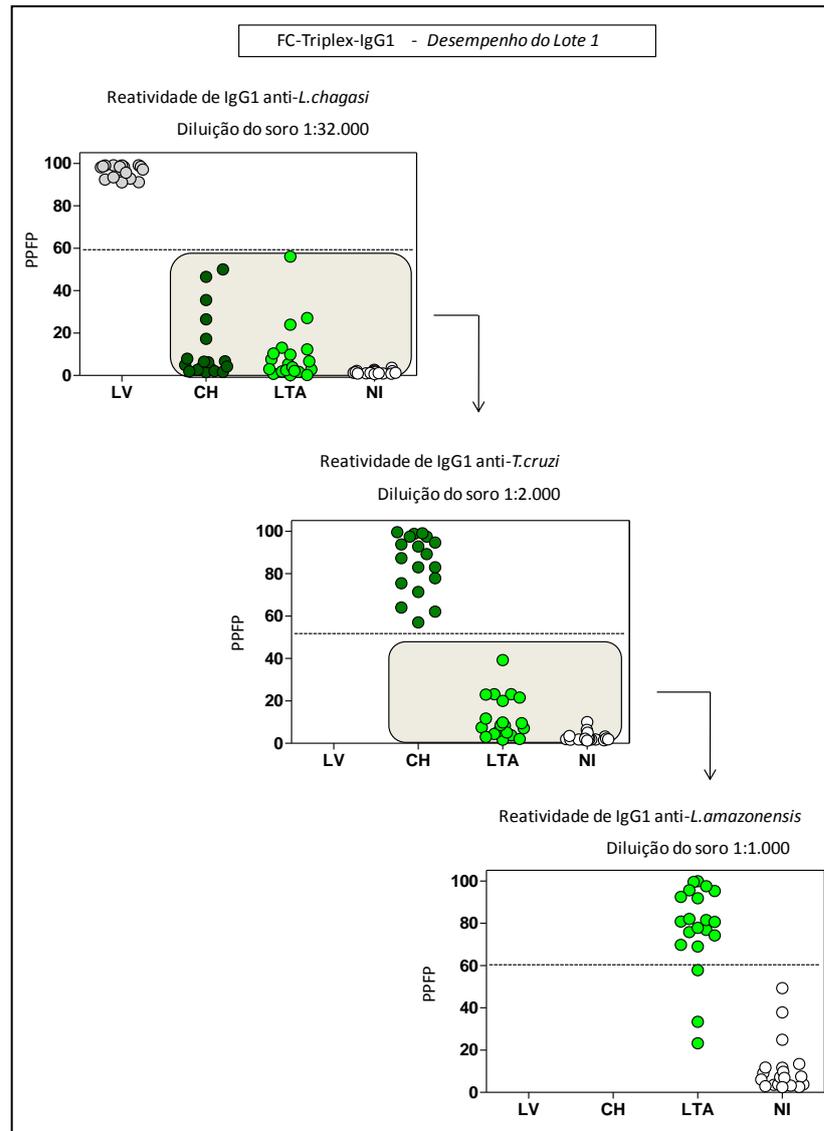


Figura 14: Reactividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com FITC em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI). O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso como PPFP. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L. chagasi* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%, na diluição do soro 1:2.000). Para a pesquisa de IgG1 anti-*T. cruzi* empregou-se como ponte de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 50%) e negativos (PPFP<50%), na diluição do soro 1:32.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L. amazonensis* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%), na diluição do soro 1:1.000.

Já no segundo lote de parasitos foram observados 94,8% (73/77) de resultados corretos, com 3 resultados falso-negativos para leishmaniose tegumentar e um resultado falso-positivo de um indivíduo não infectado, conforme gráficos abaixo (Figura 15).

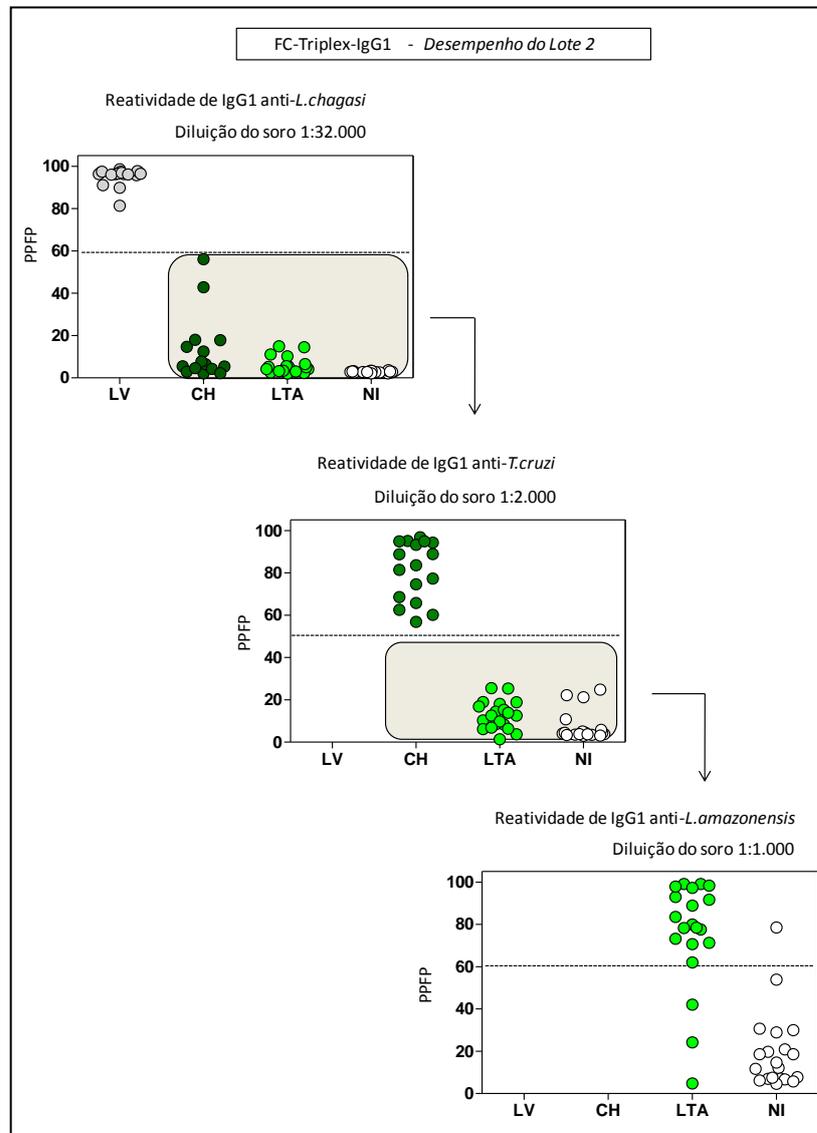


Figura 15: Reatividade de IgG1 anti-tripansomatídeos marcados com FITC em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI). O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso como PPFP. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L.chagasi* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%, na diluição do soro 1:2.000). Para a pesquisa de IgG1 anti-*T.cruzi* empregou-se como ponte de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 50%) e negativos (PPFP<50%), na diluição do soro 1:32.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L.amazonensis* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%), na diluição do soro 1:1.000.

Os resultados de outro estudo piloto, repetido e confirmado, utilizando também 77 amostras de soros bem caracterizadas, tripanosomatídeos desta vez marcados com concentrações gradativas de Alexa Flúor647 (FL-4) e um sistema de revelação da reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos com SAPE (FL-2), mostraram um desempenho ainda melhor da metodologia TRIPLEX, com 97,4% (75/77) e 98,7% (76/77) de resultados corretos.

No primeiro lote de parasitos foram observados 97,4% (75/77) de resultados corretos, um resultado falso-negativo para doença de Chagas e um falso-negativo para LT (Figura 16).

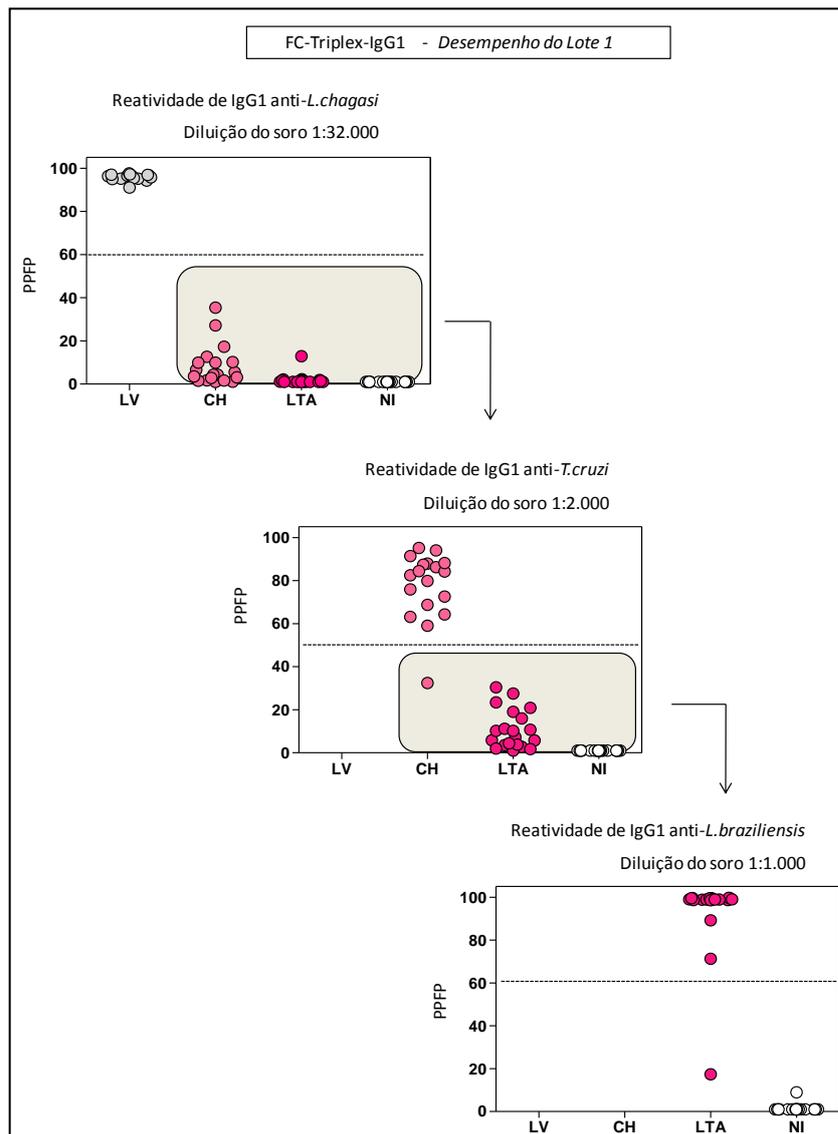


Figura 16: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomatídeos marcados com Alexa Flúor647 em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI). O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso como PFPF. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L.chagasi* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFPF \geq 60%) e negativos (PFPF<60%), na diluição do soro 1:2.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*T.cruzi* empregou-se como ponte de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFPF \geq 50%) e negativos (PFPF<50%), na diluição do soro 1:32.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L. amazonensis* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFPF \geq 60%) e negativos (PFPF<60%), na diluição do soro 1:1.000.

Já no segundo lote de parasitos foram observados 98,7% (76/77) de resultados corretos, com apenas um falso-negativo para doença de Chagas (Figura 17).

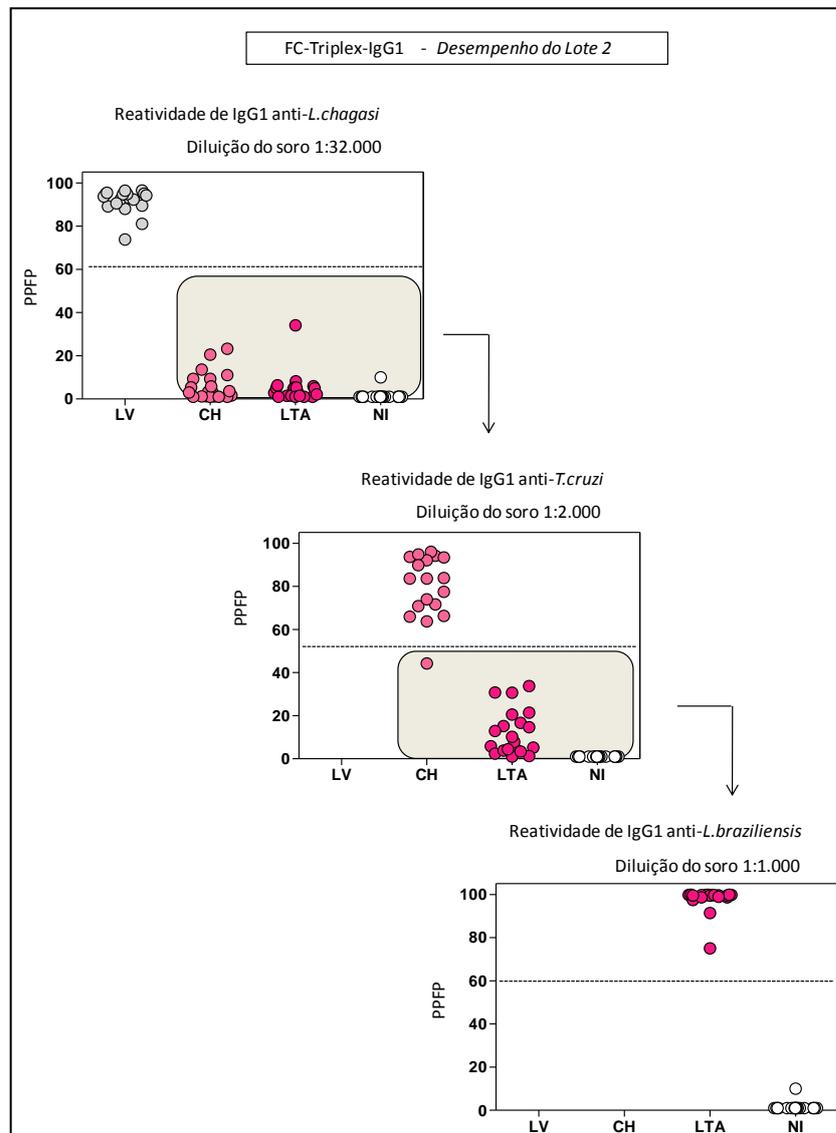


Figura 17: Reatividade de IgG1 anti-tripanosomátídeos marcados com Alexa Flúor647 em soros individuais de pacientes portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH), leishmaniose tegumentar (LT) e indivíduos não infectados (NI). O resultado da reatividade de IgG1 para cada amostra individual está expresso como PPFP. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L. chagasi* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%), na diluição do soro 1:2.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*T. cruzi* empregou-se como ponte de corte o valor de 50% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 50%) e negativos (PPFP<50%), na diluição do soro 1:32.000. Para a pesquisa de IgG1 anti-*L. amazonensis* empregou-se como ponte de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP \geq 60%) e negativos (PPFP<60%), na diluição do soro 1:1.000.

Desta forma, a análise dos resultados dos estudos pilotos demonstrou que o FC-TRIPLEX-IgG1 apresenta-se como uma nova ferramenta complementar aplicável ao diagnóstico sorológico diferencial da doença de Chagas, leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar.

4.3.4 Vantagens do método

Os métodos sorológicos HAI, RIFI e ELISA, utilizados atualmente no diagnóstico da doença de Chagas, apresentam desempenho variável relacionado principalmente à especificidade oscilante (Luquetti e Rassi, 2000). Este fator está associado, na maioria dos casos, à reatividade cruzada dos anticorpos com antígenos encontrados em parasitos pertencentes à mesma família Tripanosomatidae, como é o caso do *T. cruzi* e *Leishmania* sp. (Vexenat et al., 1996).

Na metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 a reatividade cruzada é reduzida consideravelmente, uma vez que ela é baseada no uso simultâneo e em plataforma única de formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. braziliensis*, fazendo com que os anticorpos presentes no soro-teste tenham maior avidéz pelo seu antígeno específico.

Outras vantagens incluem: simplicidade de realização da técnica; tempo de execução compatível às necessidades de liberação rápida de resultados (cerca de duas horas de teste); uso de microvolumes de amostras biológicas e de reagentes; menor influência de variáveis externas como temperatura, concentração de reagentes secundários e tempo de reação; análises isentas de variabilidades metodológicas inerentes ao analista; liberação de resultados qualitativos e semi-quantitativos; boa reprodutibilidade; menor custo relativo (devido ao uso de microvolumes de reagentes e ao fato de muitos laboratórios já possuírem o citômetro de fluxo); perspectiva de automação com uso de microplacas; e, ainda, possibilidade de realizar o diagnóstico sorológico diferencial de três doenças numa única reação.

Além disso, a citometria de fluxo utiliza lasers para excitação dos fluorocromos e células fotoelétricas potentes para a medida da emissão de fluorescência, o que aumenta a capacidade de detecção do método proposto e faz com que a sensibilidade e a especificidade sejam superiores às observadas em métodos sorológicos existentes, que utilizam protocolos de detecção e revelação convencionais.

É importante considerar também que a utilização de ensaios sorológicos múltiplos em plataforma única representa uma tendência mundial recente em diagnóstico e pesquisa. Embora já existam propostas que sugerem o uso de metodologias múltiplas em ensaios para triagem sorológica em banco de sangue, nenhuma abordagem utiliza parasitos íntegros pré-fixados visando especificamente o diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Este estudo integra o “Estudo Multicêntrico Internacional em Doadores de Sangue”, que tem como foco o desenvolvimento de pesquisas que proporcionem o aumento da segurança transfusional, especialmente no sentido de estabelecer novas tecnologias que garantam uma triagem sorológica eficaz, por meio do uso de técnicas de alta sensibilidade e especificidade (Loureiro et al., 2014).

Trata-se, portanto, de uma pesquisa aplicada com objetivo final de verificar a utilidade da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 na rotina de triagem para doença de Chagas em bancos de sangue e no diagnóstico complementar tanto da doença de Chagas quanto das leishmanioses em laboratórios de análises clínicas. Como primeiro passo para atingir este intuito, o presente estudo, de abordagem observacional e quantitativa, objetiva a comparação da metodologia proposta com os testes diagnósticos convencionais. Para isto, foi utilizado o delineamento transversal.

A comparação foi realizada com base nas mesmas amostras, de forma a eliminar variações externas aos testes. Além disso, o estudo foi mascarado, sendo as amostras codificadas para limitar o acesso à informação prévia sobre os resultados dos demais testes até que as análises fossem totalmente concluídas. O mascaramento previne vieses, tornando mais confiáveis os resultados observados.

5.2 Hipóteses do estudo

A hipótese a ser testada é se a metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 apresenta um bom desempenho em relação aos métodos convencionais tanto de triagem (ELISA e RIFI) quanto confirmatórios (recELISA) para o esclarecimento diagnóstico e a monitoração sorológica da doença de Chagas em bancos de sangue.

5.3 Variáveis do estudo

As variáveis analisadas neste estudo foram classificadas como qualitativas ou categóricas, sendo elas: resultado negativo/não reativo, resultado indeterminado/inconclusivo

(zona cinza) e resultado positivo/reactivo de acordo com cada um dos testes sorológicos realizados.

5.4 População e amostra

A população do estudo sobre esclarecimento diagnóstico foi constituída por candidatos à doação de sangue que compareceram voluntariamente em três grandes hemocentros brasileiros – Fundação HEMOMINAS, Fundação HEMOPE e Fundação PRÓ-SANGUE – de janeiro de 2007 a dezembro de 2008. De 608.590 amostras de soro analisadas pelos laboratórios de sorologia dos hemocentros neste período, 877 apresentaram *resultado não negativo* (positivo ou indeterminado) na triagem sorológica para doença de Chagas e, destas, 91 amostras de soro constituíram a amostragem deste estudo.

Já no estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem, indivíduos com *antecedente de não negatividade* na triagem sorológica para doença de Chagas realizada há 10 anos (1999) na Fundação PRÓ-SANGUE foram convidados, por carta e/ou telefone, a comparecer novamente ao hemocentro para nova coleta e retestagem da amostra. A amostragem foi constituída por 100 amostras de soro, que foram coletadas no ano de 2009.

Assim, um total de 191 amostras foram avaliadas, 91 no estudo sobre esclarecimento diagnóstico e 100 sobre monitoração sorológica pós-triagem. Além destas amostras teste, amostras de soro de indivíduos saudáveis e de indivíduos diagnosticados clínica e laboratorialmente como portadores de doença de Chagas, leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar foram utilizadas como controles nos experimentos para validação dos resultados.

5.5 Área e local do estudo

Este estudo foi desenvolvido em três grandes hemocentros brasileiros (Figura 18) e no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) localizado no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ).

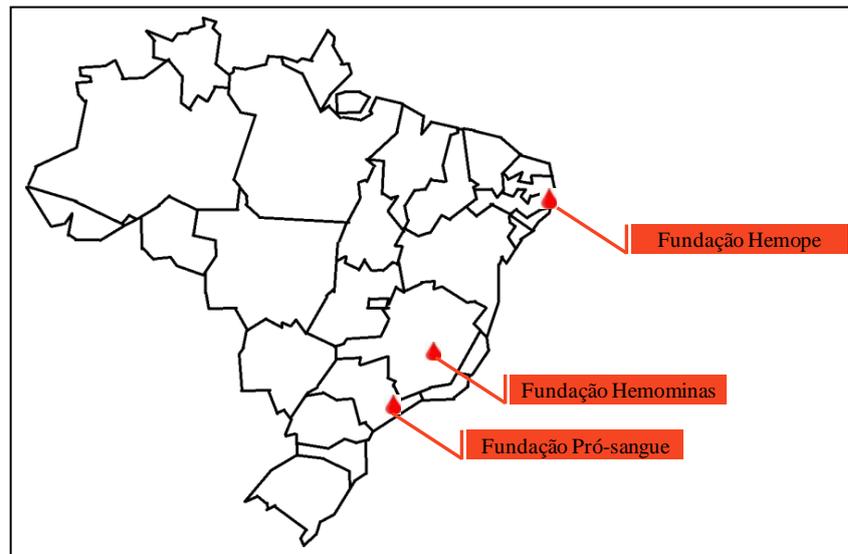


Figura 18: Localização dos hemocentros participantes do estudo.

Fonte: ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_escolares/mapas_mudos/Brasil.pdf.

A Fundação HEMOMINAS foi inaugurada em 1985 e tem como finalidade direcionar políticas estaduais relativas à hematologia e hemoterapia, garantindo à população a oferta de sangue e hemoderivados de qualidade. A unidade coordenadora da rede está localizada em Belo Horizonte/MG, mas há várias outras unidades no interior do estado. Somadas, elas atendem a maioria dos estabelecimentos de saúde de Minas, com 540 entidades conveniadas e cobertura de cerca de 90% dos procedimentos transfusionais realizados em todo o estado. Segundo dados de 2013, a Fundação HEMOMINAS é responsável por cerca de 23 mil coletas mensais, realizando aproximadamente 165 mil exames sorológicos e dando suporte direto a mais de 8 mil pacientes (HEMOMINAS, 2014).

A Fundação HEMOPE foi criada em 1977 como uma organização de caráter científico, educacional e assistencial que presta serviços nas áreas de hematologia e hemoterapia. A unidade coordenadora da rede estadual está localizada em Recife/PE. A Fundação HEMOPE tem uma média mensal de 11 mil doações, sendo que só na região metropolitana são 7,8 mil doações mensais, o que corresponde a cerca de 70% do total do estado (HEMOPE, 2014).

A Fundação PRÓ-SANGUE, foi criada em 1984 e a unidade coordenadora da rede estadual está localizada em São Paulo/SP. A Fundação PRÓ-SANGUE coleta e processa mensalmente cerca de 12 mil bolsas de sangue, realizando cerca de 108 mil exames sorológicos e 100 mil exames imunohematológicos. O sangue têm como destino mais de 100 instituições de saúde. O volume de sangue coletado equivale a aproximadamente 32% do consumido na região metropolitana de São Paulo (PRÓ-SANGUE, 2014).

O Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) ou FIOCRUZ Minas, localizado em Belo Horizonte/MG, é uma unidade regional da Fundação Oswaldo Cruz, sendo esta vinculada ao Ministério da Saúde e localizada no Rio de Janeiro/RJ. O CPqRR, nomeado em homenagem ao sanitarista que o dirigiu até o ano de 1957, realiza pesquisa, desenvolvimento e inovação em saúde, possuindo 22 grupos de pesquisa, que exercem parcerias com as principais instituições de ensino, assistência médica e pesquisa do estado de Minas Gerais, além de outras no âmbito nacional e internacional (CPqRR, 2014).

5.6 Instrumentos e procedimentos de coleta de dados

5.6.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue total foram provenientes de potenciais doadores que compareceram voluntariamente à Fundação HEMOMINAS, Fundação HEMOPE e Fundação PRÓ-SANGUE de janeiro de 2007 a dezembro de 2008 (estudo sobre esclarecimento diagnóstico) ou foram convidados a comparecer à Fundação PRÓ-SANGUE no ano de 2009 (estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem). As coletas foram executadas assepticamente por punção venosa e em tubos contendo anticoagulante (EDTA, heparina ou citrato). Em seguida, o sangue total foi processado por centrifugação para obtenção dos soros, sendo estes alíquotados, devidamente identificados e estocados em freezer a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

No momento do uso, as amostras de soro foram descongeladas, homogeneizadas e centrifugadas para remoção de partículas (14.000 rpm, 5 minutos). Além disto, para realização do FC-TRIPLEX-IgF1, elas foram também inativadas pela temperatura (56°C , 30 minutos), diluídas em solução salina tamponada com fosfato-PBS suplementado com 3% de soro fetal bovino (SBF – GIBCO) e centrifugadas (13.000 rpm, 5 minutos), sendo o sobrenadante utilizado no teste.

5.6.2 Estudo sobre esclarecimento diagnóstico

Após coleta e processamento das amostras de sangue, os hemocentros realizaram a triagem sorológica para doença de Chagas com os soros dos candidatos à doação. Para isto, foi utilizada a metodologia ELISA empregando kits de fabricantes diferentes, conforme disponibilidade no momento da realização do teste.

Os kits ELISA utilizados foram os seguintes: Chagateck ELISA (Biomérieux), que usa antígenos purificados de *T. cruzi* e apresenta sensibilidade de 100% e especificidade superior a 99%; ELISA Cruzi (Biomérieux), que usa como antígeno um extrato bruto obtido a partir da extração alcalina de formas epimastigotas do *T. cruzi*, com sensibilidade de 100% e especificidade superior a 98%; Gold ELISA Chagas (REM), que usa uma combinação de antígenos recombinantes e lisados purificados de formas epimastigotas do *T. cruzi*, com 100% de sensibilidade e 99,7% de especificidade; e Test ELISA Chagas III (Bioschile Ingenieria Genética S.A., Santiago, Chile), que usa extratos totais de *T. cruzi*, incluindo antígenos de membrana altamente imunogênicos, e apresenta sensibilidade e especificidade de 100%. Os valores de sensibilidade e especificidade descritos foram obtidos nos estudos de desempenho realizados pelos próprios fabricantes e foram extraídos dos respectivos protocolos dos kits.

O valor do ponto de corte considerado para análise dos resultados em bancos de sangue é menor do que o considerado em laboratórios de análises clínicas, visando diminuir ainda mais o risco de um resultado falso-negativo. Assim, independente do kit ELISA utilizado, os hemocentros classificaram como indeterminadas (zona cinza) as amostras com índice de reatividade entre 0.8 e 1.2 (zona de indeterminação), como negativas as amostras com índice de reatividade inferior a 0.8, e como positivas as amostras com índice de reatividade superior a 1.2. Todas as bolsas de sangue correspondentes às amostras positivas ou indeterminadas foram descartadas para doação.

O ELISA realizado nos hemocentros foi denominado ELISA-I e parte das amostras com resultado não negativo foi selecionada e enviada ao laboratório para realização deste estudo (n=91). Como forma complementar de triagem foram realizados os testes ELISA (Chagateck ELISA ou ELISA Cruzi, ambos da Biomérieux), que foi denominado ELISA-II, e RIFI (ImunoCruzi, Biomérieux, com sensibilidade de 100% e especificidade de 95%).

Para uma mesma amostra, o ELISA-II foi realizado, necessariamente, com um kit diferente daquele utilizado no ELISA-I e foram usados os critérios dos fabricantes para considerar as amostras como positivas, indeterminadas ou negativas. Em relação aos resultados da RIFI, as amostras foram consideradas positivas quando o título foi maior que 1/20 e indeterminadas quando o título foi igual a 1/20.

Assim, em cada amostra, foram realizados dois testes ELISA (denominados ELISA-I e ELISA-II) e apenas um teste RIFI. Baseado nos resultados dos três testes de triagem realizados, as amostras com sorologia não negativa (n = 91) foram classificadas em dois subgrupos: DISC_T (discordantes na triagem), quando os resultados de um ou mais testes

foram diferentes, e POS_T (positivas na triagem), quando todos os testes apresentaram resultados reativos.

Para confirmação dos resultados e esclarecimento diagnóstico das amostras inconclusivas foram realizados os métodos sorológicos confirmatórios Chagatest ELISA recombinante v.3.0 (Wiener Lab, Rosário, Argentina), já disponível no mercado, e a nova metodologia FC-TRIPLEX-IgG1.

O ELISA recombinante, denominado neste estudo de recELISA, constitui-se em um método de 3^a geração, com sensibilidade de 98,8% e especificidade de 99%. Ele utiliza uma mistura antigênica composta por 6 antígenos recombinantes (1, 2, 13, 30, 36 e SAPA), provenientes de proteínas específicas das formas tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*.

Os resultados de todos os testes realizados foram estatisticamente comparados com a finalidade de se verificar o desempenho da nova metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 em relação às metodologias já existentes no mercado.

Considerando que as amostras foram coletadas em regiões co-endêmicas para doença de Chagas e leishmanioses, que os testes sorológicos estão propensos à reação cruzada e que o FC-TRIPLEX-IgG1 possui potencial para diagnosticar ambas as doenças, a positividade para as leishmanioses também foi verificada para todas as amostras.

O fluxograma da metodologia do estudo sobre esclarecimento diagnóstico está representado na Figura 19.

5.6.3 Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem

Os candidatos à doação de sangue que compareceram voluntariamente à Fundação PRÓ-SANGUE, localizada em São Paulo/SP, e apresentaram resultado não negativo na triagem sorológica para doença de Chagas realizada no ano de 1999 foram convidados a comparecer novamente ao hemocentro 10 anos depois para coleta de nova amostra de sangue.

As amostras de soro destes indivíduos (n = 100) foram selecionadas com base nos resultados da retestagem para doença de Chagas utilizando os testes convencionais ELISA (Biomérieux) e RIFI (Biomérieux). As amostras com resultado negativo em ambos os testes foram classificadas como ELISA-RIFI-, enquanto as amostras com resultado positivo em ambos os testes foram classificadas como ELISA+RIFI+.

Os testes confirmatórios recELISA – Chagatest ELISA recombinante v.3.0 (Wiener Lab, Rosário, Argentina) – e FC-TRIPLEX-IgG1 foram realizados em todas as amostras. Os resultados foram estatisticamente comparados com a finalidade de verificar o desempenho da

nova metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 em relação às metodologias já existentes no mercado para a monitoração sorológica de indivíduos com precedente de não negatividade na triagem sorológica para doença de Chagas.

O fluxograma da metodologia do estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem está representado na Figura 19.

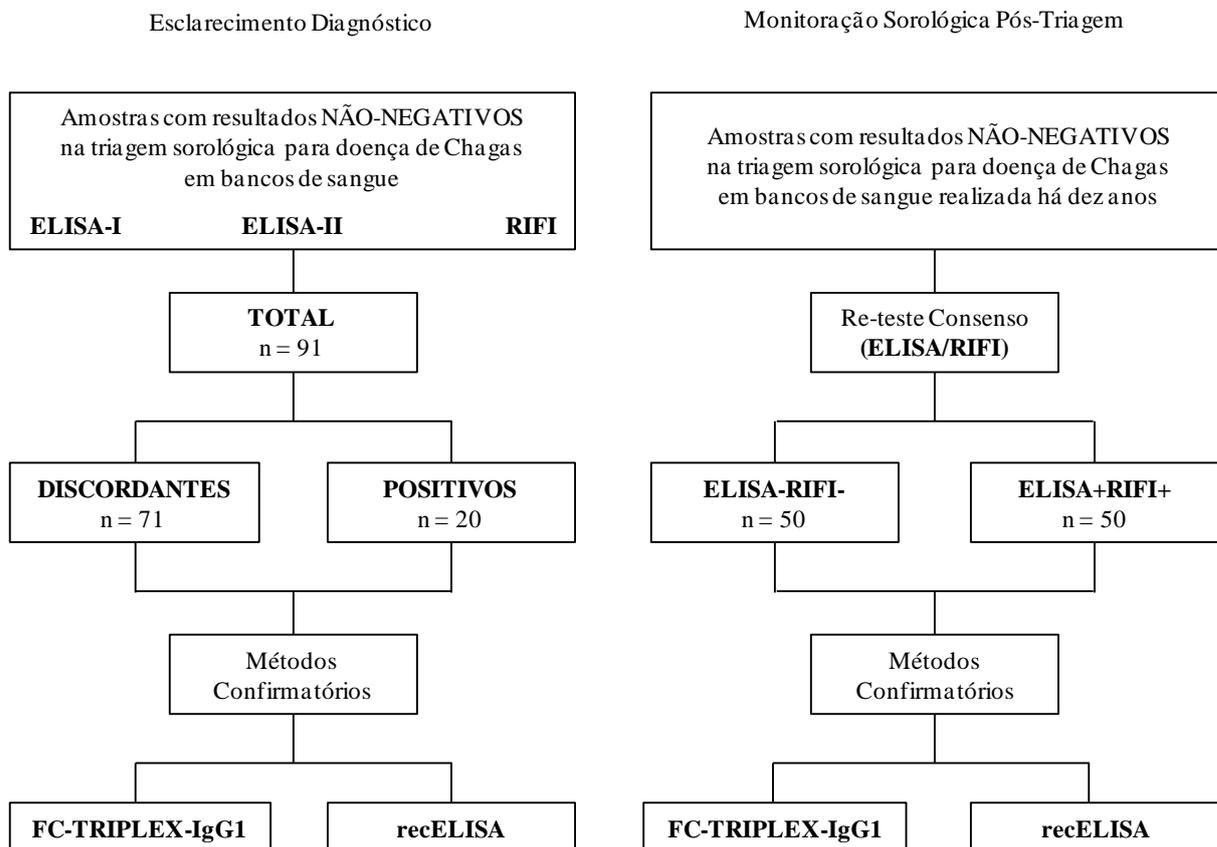


Figura 19: Fluxograma da metodologia do estudo sobre o esclarecimento diagnóstico e sobre a monitoração sorológica pós-triagem.

5.6.4 Métodos convencionais de diagnóstico sorológico da doença de Chagas

Todos os testes foram realizados segundo as instruções dos fabricantes e os procedimentos seguiram todas as precauções de segurança recomendadas. Os cálculos do valor do cut-off, bem como a leitura e interpretação dos resultados, foram realizados conforme descrito nas respectivas sessões dos protocolos de cada kit diagnóstico (exceto o ELISA-I, realizado nos hemocentros, conforme explicado acima).

5.6.4.1 Ensaio imunoenzimático convencional (ELISA) e recombinante (recELISA)

A tecnologia ELISA, desenvolvida na década de 1970, consiste em um ensaio imunoenzimático amplamente utilizado para detecção de antígenos e anticorpos de uma ampla variedade de doenças infecciosas.

O ELISA convencional utiliza como antígeno o lisado parasitário total, enquanto o ELISA recombinante (recELISA) utiliza apenas proteínas consideradas altamente antigênicas selecionadas do parasito por meio da tecnologia do DNA recombinante.

No diagnóstico da doença de Chagas, o ELISA permite a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro ou plasma humanos por meio da mudança de cor da reação. Na primeira etapa de incubação, antígenos de *T. cruzi* existentes na fase sólida (poços da placa onde é realizado o ensaio) capturam anticorpos anti-*T. cruzi* do soro teste, caso eles estejam presentes, formando complexos estáveis antígeno-anticorpo. Após lavagem para eliminação das imunoglobulinas não ligadas, ocorre a segunda etapa de incubação, em que anticorpos monoclonais anti-imunoglobulina humana conjugados com a enzima peroxidase se ligam aos complexos formados. Então, uma segunda etapa de lavagem é realizada para remoção do conjugado enzimático não ligado e, em seguida, ocorre a incubação com substrato cromogênico (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina-TMB) para revelar a presença da peroxidase. Se o conjugado ligado estiver presente, a peroxidase irá clivar o peróxido de hidrogênio, resultando em um composto intermediário que oxida o TMB e forma um produto final de cor azul. Após a incubação, é adicionado um reagente de bloqueio ácido para interromper a reação enzimática e o TMB oxidado adquire coloração amarela. A intensidade da cor é medida pelo espectrofotômetro, sendo proporcional à quantidade de conjugado ligado e, portanto, à concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* presente na amostra.

5.6.4.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de RIFI é baseada na interação de antígenos do *T. cruzi* fixados em uma lâmina de vidro com anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, caso eles estejam presentes no soro teste. Ao ser adicionado o conjugado, composto por uma anti-imunoglobulina humana ligada à uma substância fluorescente denominada isotiocianato de fluoresceína, este servirá como revelador da ligação antígeno-anticorpo.

A leitura dos resultados é feita ao microscópio de fluorescência. A amostra é considerada reagente caso haja fluorescência uniforme em toda a membrana dos

tripanosomas, não reagente em caso de ausência total de fluorescência, e indeterminada quando há fluorescência inespecífica caracterizada por qualquer padrão diferente dos anteriormente descritos. A RIFI quantitativa determina, ainda, o título das amostras reagentes (LIAC, 2014).

5.6.5 Metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1)

O FC-TRIPLEX-IgG1 consiste em uma reação de imunofluorescência indireta, realizada em uma suspensão líquida, empregando formas epimastigotas do *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. chagasi* e de *L. braziliensis* para pesquisa simultânea de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi*, anti-*L. chagasi* e anti-*L. braziliensis* por citometria de fluxo. Na presença destes anticorpos, ocorre a reatividade sorológica.

Os parasitos utilizados são previamente fixados, diferencialmente marcados com concentrações gradativas de fluorocromo e combinados em plataforma única, o que possibilita a análise simultânea de diferentes grupos de anticorpos específicos em um único teste de imunofluorescência, empregando a citometria de fluxo como método de segregação de parasitos e amplificação dos sinais de fluorescência nas etapas de leitura e análise de dados.

A utilização de um sistema de análise da subclasse IgG1 e de um algoritmo de análise e interpretação dos resultados da reatividade em diluições seriadas pré-selecionadas da amostra teste representam componentes adicionais de inovação e ineditismo no desenvolvimento da metodologia.

5.6.5.1 Obtenção e preparo dos parasitos

O FC-TRIPLEX-IgG1 utiliza formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Os parasitos foram cultivados em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e incubados a 28°C e 24°C, respectivamente, para realização dos ensaios. Após sete dias para epimastigotas e dois dias para promastigotas, as culturas com aproximadamente $3,0 \times 10^6$ parasitos/mL foram examinadas quanto a motilidade, morfologia e ausência de contaminação e, em seguida, foram re-inoculadas em um novo frasco contendo M199. Desta forma, as cultura foram mantidas rotineiramente no laboratório (Cordeiro et al., 2001; Rocha et al., 2002).

Posteriormente, a suspensão de cada parasito foi transferida para tubos Falcon, homogeneizada em vórtex a baixa rotação para desfazer os grumos e centrifugada em baixa

velocidade (300 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) para remoção de detritos celulares e contaminantes como eritrócitos. Para recuperação dos parasitos no sobrenadante, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Os parasitos recuperados no sobrenadante foram lavados três vezes com PBS 3% SFB (2.500 rpm, 4°C, 7 minutos) e fixados utilizando solução fixadora MFF (*Mac's Facs Fix*) e PBS 3% SFB (4°C, 24 horas). Para os ensaios de citometria, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e sua concentração foi ajustada para $5,0 \times 10^6$ parasitos/mL em PBS (Cordeiro et al., 2001; Rocha et al., 2002).

Os tripanosomatídeos fixados e ajustados foram incubados separadamente (37°C, 30 minutos, ao abrigo da luz, sob agitação constante) com concentrações gradativas de Alexa flúor647, de forma que a população de *L. braziliensis* fosse intensamente marcada (125µL de fluorocromo), a de *T. cruzi* moderadamente marcada (7,8µL de fluorocromo) e a de *L. chagasi* permanecesse sem marcação. Após três lavagens com PBS 3% SFB (2.200 rpm, 4°C, 10 minutos), os parasitos marcados foram ressuspensos e armazenados (4°C, 24 horas, protegidos da luz) até o momento do uso.

A fixação com MFF é necessária para manter a integridade dos parasitos, inibindo alterações celulares geradas por vias metabólicas ou energéticas. A fixação preserva também as marcações, possibilitando a análise posterior no citômetro de fluxo. Durante todo o processo de preparo e também na reação de imunofluorescência indireta descrita abaixo, os parasitos são submetidos a lavagens sequenciais com PBS 3% SFB, a fim de remover impurezas da suspensão que podem influenciar na viabilidade, morfologia e funcionalidade celular, como células mortas, *debris*, anticorpos que não se ligaram ao antígeno, excesso de soluções de bloqueio e de fixação. A salina tamponada com fosfato (PBS) tem como função manter o pH e a quantidade adequada de sal na solução, enquanto o soro fetal bovino (SFB) é um suplemento amplamente utilizado por conter baixo nível de anticorpos e muitos fatores de crescimento para as células (de Carvalho et al., 2010).

5.6.5.2 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo

Para realização dos ensaios, foram utilizadas microplacas com fundo em “U”, contendo 96 poços. Uma suspensão mista com 50µL dos parasitos foi incubada (37°C, 30 minutos, ao abrigo da luz) com 50µL de soro humano inativado e diluído de forma seriada de 1:250 a 1:32.000 em PBS 3% SFB. Após incubação com o soro, os parasitos foram

duplamente lavados em 150µL de PBS 3% SFB por centrifugação (2.200 rpm, 18°C, 10 minutos) e o sobrenadante foi desprezado.

Para revelação da ligação de IgG1 na superfície dos parasitos, procedeu-se a incubação (37°C, 30 minutos, ao abrigo da luz) com 50µL de anticorpo monoclonal anti-IgG1 humano biotilado (diluição 1:6.400 em PBS-3% SFB) e 20µL do conjugado estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE, diluição 1:400 em PBS 3% SFB).

Após a incubação, os parasitos foram novamente lavados duas vezes com 150uL de PBS 3% SBF por centrifugação (2.200 rpm, 18°C, 10 minutos) e o sobrenadante foi desprezado. Os parasitos foram, então, ressuspensos com 200µL de solução fixadora para citometria (MFF) e as amostras foram mantidas a 4°C, por pelo menos 30 minutos, ao abrigo da luz. O tempo máximo para a leitura no citômetro de fluxo e aquisição dos dados foi de 24 horas após fixação dos parasitos.

Para validação dos resultados e monitoramento das ligações inespecíficas, em cada conjunto de testes foram adicionados um controle negativo, constituído por soro de indivíduo não infectado (NI); três controles positivos, constituídos por soros de indivíduos portadores de leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (DC) e leishmaniose tegumentar (LT); e um controle da reação/do conjugado (CC), constituído por parasitos fixados incubados na ausência de soro humano, porém na presença do anticorpo secundário.

Os passos descritos estão ilustrados na Figura 20.

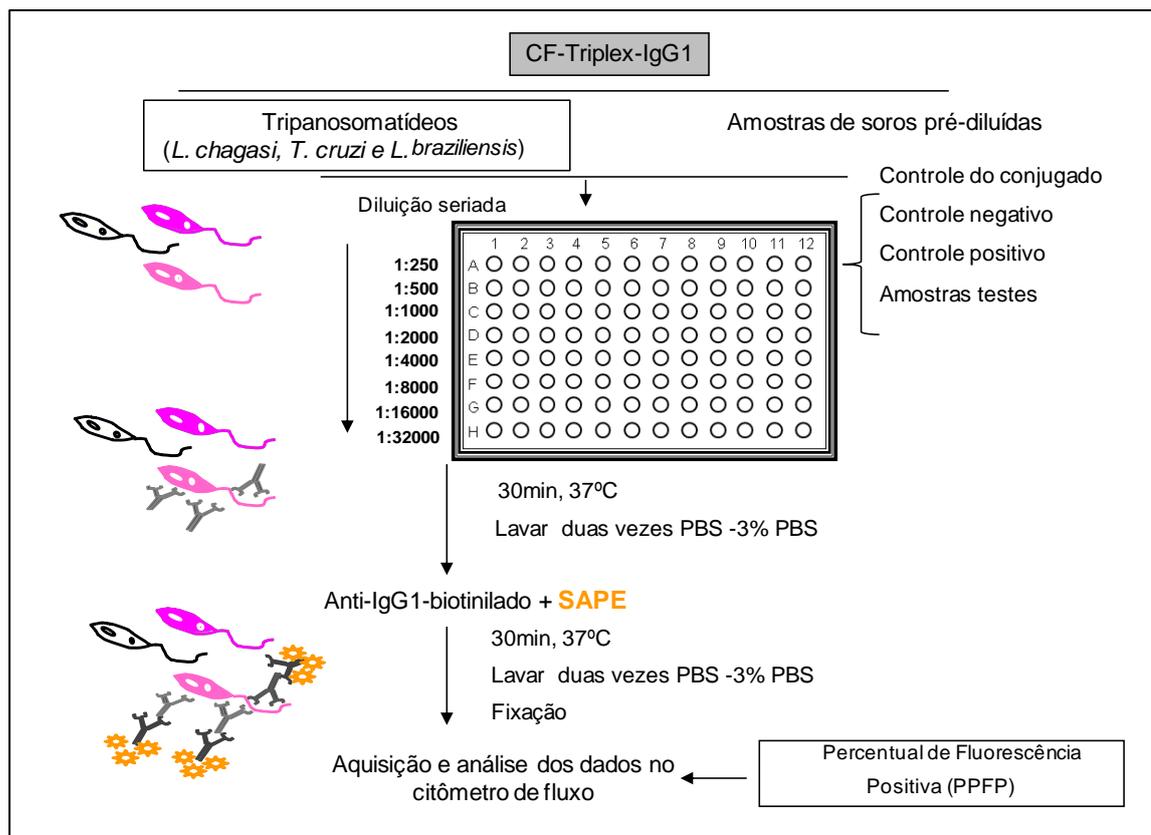


Figura 20: Representação esquemática do FC-TRIPLEX-IgG1.

5.6.5.3 Obtenção dos dados de citometria de fluxo

A citometria de fluxo utiliza um sistema óptico eletrônico para identificar células ou partículas através da ligação destes a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. Quando o fluorocromo intersecta o *laser* do aparelho, ocorre a dispersão luminosa, que permite a avaliação de parâmetros morfológicos (tamanho: FSC – *Forwards Scatter* e granulosidade ou complexidade interna: SSC – *Side Scatter*) e a emissão de fluorescência, que permite verificar a presença do antígeno ou anticorpo de interesse (Madeya e Pfab-Tokarsky, 1992; Traganos, 1994).

A aquisição dos dados do estudo foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson) empregando o software *Cell-Quest*. As análises dos dados obtidos foram realizadas no programa FlowJo 7.6.5. Para cada amostra foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 10.000 parasitos.

Como *T. cruzi* e *Leishmania* spp. apresentam aspectos morfométricos similares, a distribuição desses parasitos no gráfico de tamanho *versus* granulosidade é homogênea, o que permite o posicionamento de um marcador (R1) sobre a região correspondente à população celular de interesse.

Os parasitos marcados com concentrações gradativas de Alexa flúor647 emitem sinais luminosos correspondentes à fluorescência do tipo 4 (FL-4, fluorescência cor-de-rosa) quando excitados, enquanto os anticorpos biotinilados marcados com SAPE, se presentes, emitem sinais luminosos correspondentes à fluorescência do tipo 2 (FL2 - fluorescência laranja) quando excitados. Assim, nos gráficos de FL-4 *versus* FL-2, os parasitos que não emitem FL-4 correspondem às formas promastigotas de *L. chagasi*, os que apresentam baixa intensidade de FL-4 correspondem às formas epimastigotas de *T. cruzi* e os que apresentam alta intensidade de FL-4 correspondem às formas promastigotas de *L. braziliensis*. Esta separação permite o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente a cada uma dessas populações de parasitos (R2, R3 e R4, respectivamente).

Para cada população de parasitos selecionada foi estabelecido um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (M1). Em seguida, foi determinado o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), correspondente aos resultados das análises de fluorescência FL-2 apresentados pelos parasitos após a incubação com os soros.

Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de, no máximo, 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado) e, empregando o mesmo limiar, foram obtidos os valores de PPFP para cada amostra de soro avaliada com cada espécie de tripanosomatídeo - *L. chagasi*, *T. cruzi* e *L. braziliensis*.

Para cada conjunto de ensaios, um novo marcador foi posicionado empregando o controle do conjugado daquele experimento. Esse tipo de parâmetro oferece vantagens como facilidade e rapidez para obtenção dos resultados, além de reprodutibilidade dos dados obtidos em análises inter laboratoriais ou em análises realizadas repetidas vezes.

A Figura 21 ilustra os passos descritos para a obtenção dos dados de citometria de fluxo.

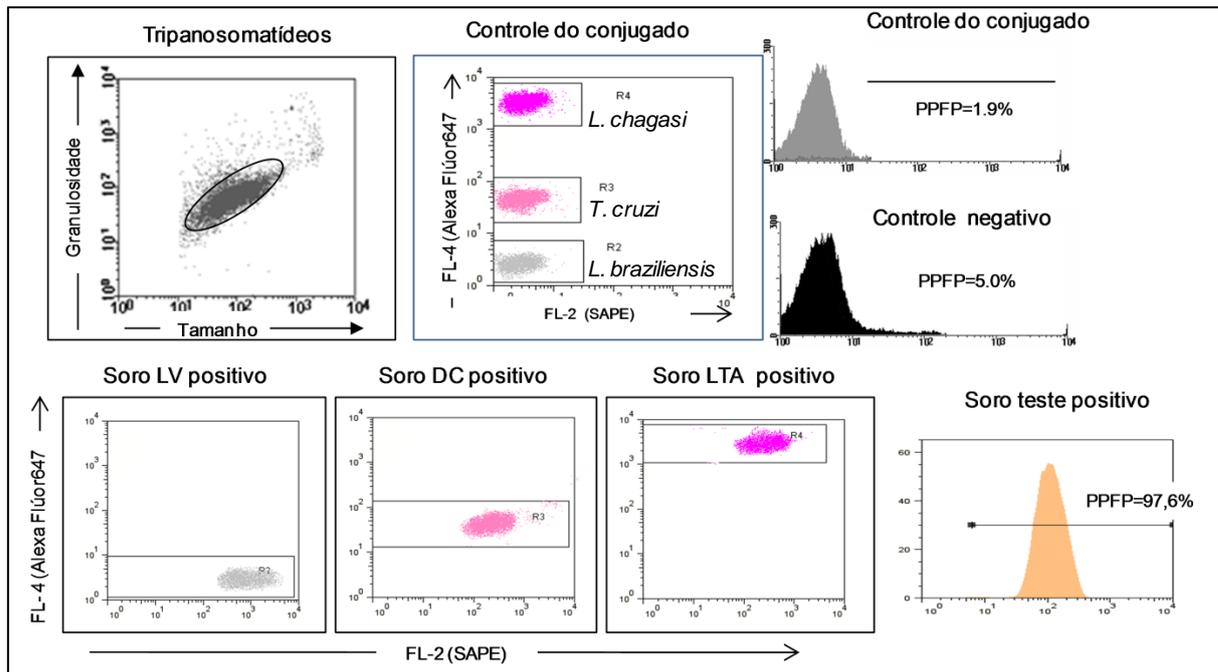


Figura 21: Representação esquemática da sequência de análises dos dados obtidos por citometria de fluxo: seleção da população de tripanosomatídeos de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade e histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP).

5.6.5.4 Interpretação dos resultados

Com o objetivo de minimizar a reatividade cruzada no diagnóstico diferencial da doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, o FC-TRIPLEX-IgG1 utiliza um algoritmo dessincronizado na pesquisa concomitante de anticorpos IgG1 anti-*L. chagasi*, anti-*T. cruzi* e anti-*L. braziliensis* em uma mesma amostra de soro. A interpretação dos resultados segue os critérios descritos abaixo.

A primeira avaliação consiste na análise da reatividade de IgG1 anti-*L. chagasi* na diluição do soro 1:32.000, considerando o ponto de corte de PPFP=60%. Assim, dado um valor de PPFP \geq 60%, o resultado é considerado positivo para leishmaniose visceral. Dado um valor de PPFP<60%, o resultado é considerado negativo e segue-se para o próximo passo.

A segunda avaliação consiste na análise da reatividade de IgG1 anti-*T. cruzi* na diluição do soro 1:2.000, considerando o ponto de corte de PPFP=50%. Assim, dado um valor de PPFP \geq 50%, o resultado é considerado positivo para doença de Chagas. Dado um valor de PPFP<50%, o resultado é considerado negativo e segue-se para o próximo passo.

A terceira avaliação consiste na análise da reatividade de IgG1 anti-*L. braziliensis* na diluição do soro 1:1.000, considerando o ponto de corte de PFP=60%. Assim, dado um valor de PFP \geq 60%, o resultado é considerado positivo para leishmaniose tegumentar. Dado um valor de PFP<60%, o resultado é considerado negativo e o soro é classificado como não reativo para os tripanosomatídeos e, portanto, o indivíduo não está infectado.

A Figura 22 mostra o algoritmo de interpretação de resultados do FC-TRIPLEX-IgG1.

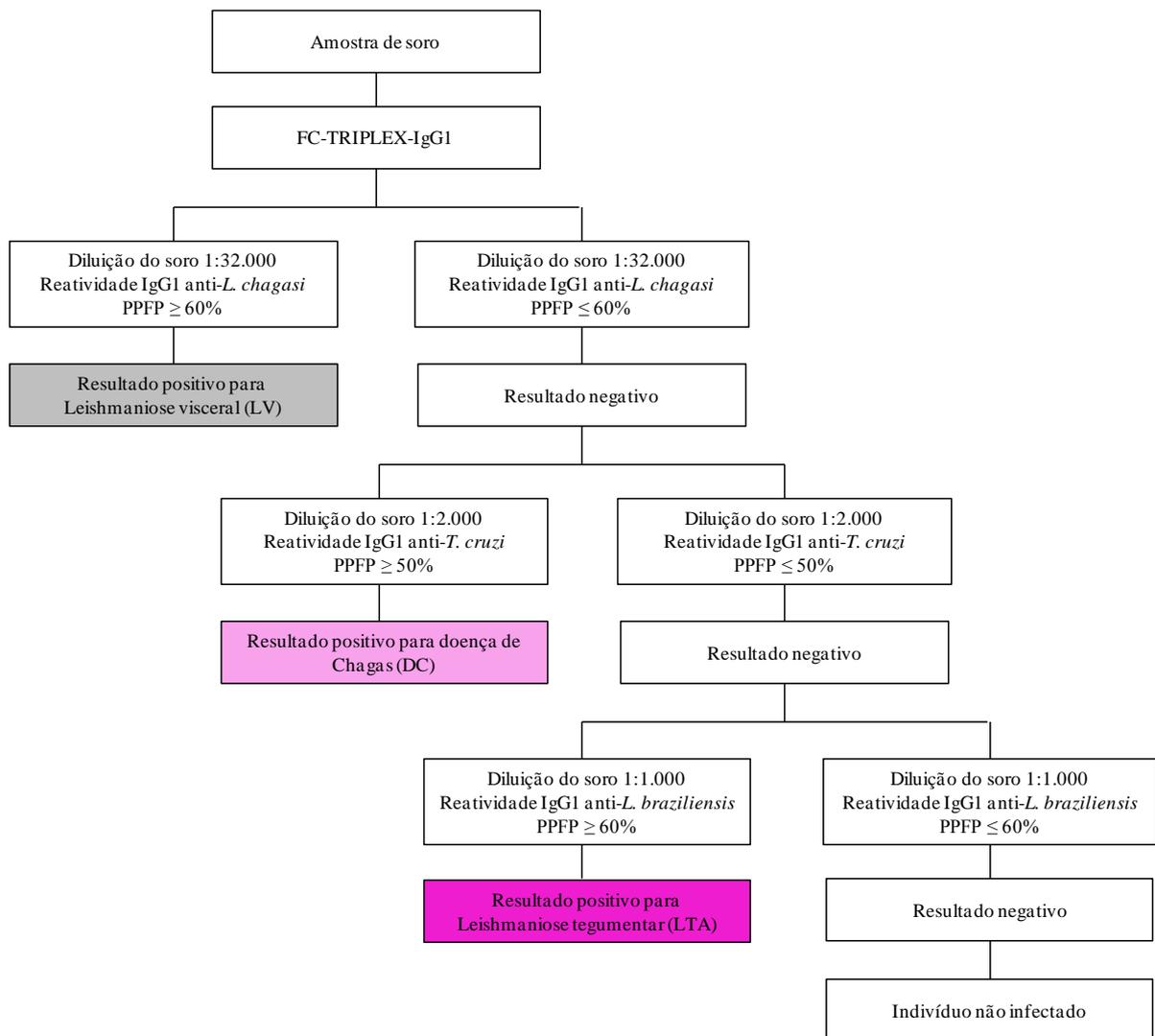


Figura 22: Algoritmo para interpretação dos resultados do FC-TRIPLEX-IgG1.

A Tabela 1 apresenta os possíveis resultados das análises de fluorescência, expressos em PFP, apresentados por *L. chagasi*, *T. cruzi* e *L. braziliensis* considerando os pontos de corte de PFP=60%, PFP=50% e PFP=60%, respectivamente, após incubação com o soro de paciente portador de LV, de DC, de LT e de indivíduo NI.

Tabela 1: Resultados possíveis do FC-TRIPLEX-IgG1 em soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), doença de Chagas (CH) e leishmaniose tegumentar (LT).

Soro	<i>L. chagasi</i> (1:32.000) ≥60%PPFP	<i>T. cruzi</i> (1:2.000) ≥50%PPFP	<i>L. braziliensis</i> (1:1.000) ≥60%PPFP
Leishmaniose visceral	+	+/-	+/-
Doença de Chagas	-	+	+/-
Leishmaniose tegumentar	-	-	+
Não infectado	-	-	-

5.7 Análise estatística

Todas as informações obtidas durante a realização da pesquisa foram digitadas em bancos de dados por meio de dupla entrada e posterior correção das divergências detectadas.

Tabelas de contingência foram construídas para resumir os resultados da comparação do FC-TRIPLEX-IgG1 com os demais métodos sorológicos utilizados. Em seguida, o valor p foi calculado por meio do teste exato de Fisher (em tabelas 2x2) ou do teste qui-quadrado (em tabelas com mais de duas linhas e/ou colunas) para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos testes (Callegari-Jaques, 2003).

Para medir o grau de concordância entre os testes foi calculado o índice kappa (k), considerando que: $k < 0$ = concordância nula; $0 < k < 0,19$ = concordância pobre; $0,20 < k < 0,39$ = concordância falha; $0,40 < k < 0,59$ = concordância moderada; $0,60 < k < 0,79$ = concordância boa; e $0,80 < k < 1,00$ = concordância excelente (Callegari-Jaques, 2003).

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o GraphPad Prism 5, considerando o Intervalo de Confiança (IC) de 95% e o nível de significância de 5%.

5.8 Considerações éticas

O estudo foi realizado em concordância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (N.157/2007) (Anexo A).

Os doadores que compareceram aos hemocentros e concordaram voluntariamente em participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), responderam a um questionário e colheram a amostra de sangue. Os indivíduos foram identificados através de números de registro e tiveram sua privacidade e anonimato totalmente assegurados.

6 RESULTADOS

6.1 Estudo sobre esclarecimento diagnóstico

6.1.1 Caracterização das amostras estudadas

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008, os laboratórios de sorologia dos três hemocentros participantes deste estudo analisaram um total de 608.590 amostras de soro de doadores de sangue, sendo que 877 (0,14%) apresentaram resultado não negativo na triagem sorológica para doença de Chagas. Destas, foram utilizadas cerca de 10% para a realização deste estudo, totalizando 91 amostras: 25/91 coletadas na Fundação HEMOMINAS em Belo Horizonte/MG, 39/91 na Fundação HEMOPE em Recife/PE e 27/91 na Fundação PRÓ-SANGUE em São Paulo/SP, conforme representado na Figura 23.

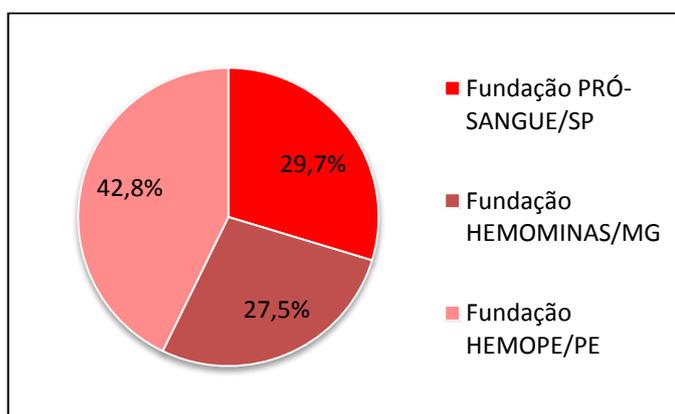


Figura 23: Distribuição das amostras do estudo de acordo com o hemocentro de origem.

6.1.2 Triagem sorológica para doença de Chagas através dos testes *ELISA-I*, *ELISA-II* e *RIFI*

As amostras foram triadas com métodos convencionais amplamente utilizados para diagnóstico da doença de Chagas, sendo eles dois testes ELISA e um teste RIFI.

O primeiro teste de triagem, denominado ELISA-I, foi realizado nos hemocentros utilizando quatro kits comerciais diferentes, conforme disponibilidade no momento de realização do teste. Assim, 32/91 amostras foram testadas com o kit ELISA Cruzei (Biolab-Mérieux); 25/91 amostras foram testadas com o kit Test ELISA Chagas III (Bioschile); 20/91 amostras foram testadas com o kit Gold ELISA Chagas (REM); e 14/91 amostras foram

testadas com o kit Chagateck ELISA (Biolab-Mérieux). O ELISA-I apresentou resultado positivo para 47/91 (51,6%) amostras e indeterminado para 44/91 (48,4%) amostras.

O segundo teste de triagem realizado, denominado ELISA-II, apresentou resultado positivo para 62/91 (68,1%) amostras, indeterminado para 8/91 (8,8%) amostras e negativo para 21/91 (23,1%) amostras. Foram utilizados dois kits comerciais, sendo que 49/91 amostras foram testadas com o kit Chagateck ELISA (Biolab-Mérieux); e 42/91 amostras foram testadas com o kit ELISA Cruzei (Biolab-Mérieux). Para uma mesma amostra, o kit usado no ELISA-I foi necessariamente diferente do usado no ELISA-II.

O terceiro e último teste de triagem realizado foi a RIFI (Biolab-Mérieux), que apresentou resultado positivo para 25/91 (27,5%) amostras (título médio de 1:160), indeterminado para 6/91 (6,6%) amostras (título igual a 1:20) e negativo para 60/91 (65,9%) amostras.

6.1.3 Confirmação do diagnóstico da doença de Chagas através dos métodos recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1

Na tentativa de esclarecer os resultados encontrados nos três testes de triagem para a doença de Chagas, foram realizados dois testes confirmatórios: recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1. O teste confirmatório recELISA apresentou resultado positivo para 55/91 (60,4%) amostras e negativo para 36/91 (39,6%) amostras. De todos os resultados indeterminados nos três testes de triagem, o recELISA foi negativo em 53,4%.

O teste confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 apresentou resultado positivo em 32/91 (35,2%) amostras (PPFP \geq 50%) e negativo em 59/91 (64,8%) amostras. De todos os resultados indeterminados nos três testes de triagem, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi negativo em 86,2%. Esta nova metodologia é capaz de realizar o diagnóstico diferencial entre doença de Chagas, leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar e, assim, das amostras negativas para doença de Chagas, 1/59 (1,7%) foi positiva para LV (PPFP \geq 60%), 21/59 (35,6%) foram positivas para LT (PPFP \geq 60%) e 37/59 (62,7%) foram negativas para as três doenças. As amostras positivas para doença de Chagas apresentaram PPFP médio de 78,4, a amostra positiva para LV apresentou PPFP igual a 95,5 e as amostras positivas para LT apresentaram PPFP médio de 77,0.

De acordo com os resultados do FC-TRIPLEX-IgG1, a positividade para doença de Chagas foi maior entre as amostras provenientes de Pernambuco (20/32), seguido de São Paulo (11/32) e de Minas Gerais (1/32). Por outro lado, positividade para leishmanioses foi

maior entre as amostras de Minas Gerais (12/22), seguido de Pernambuco (9/22) e de São Paulo (1/22).

Os resultados descritos para todos os métodos realizados, tanto os de triagem quanto os confirmatórios, estão representados na Figura 24.

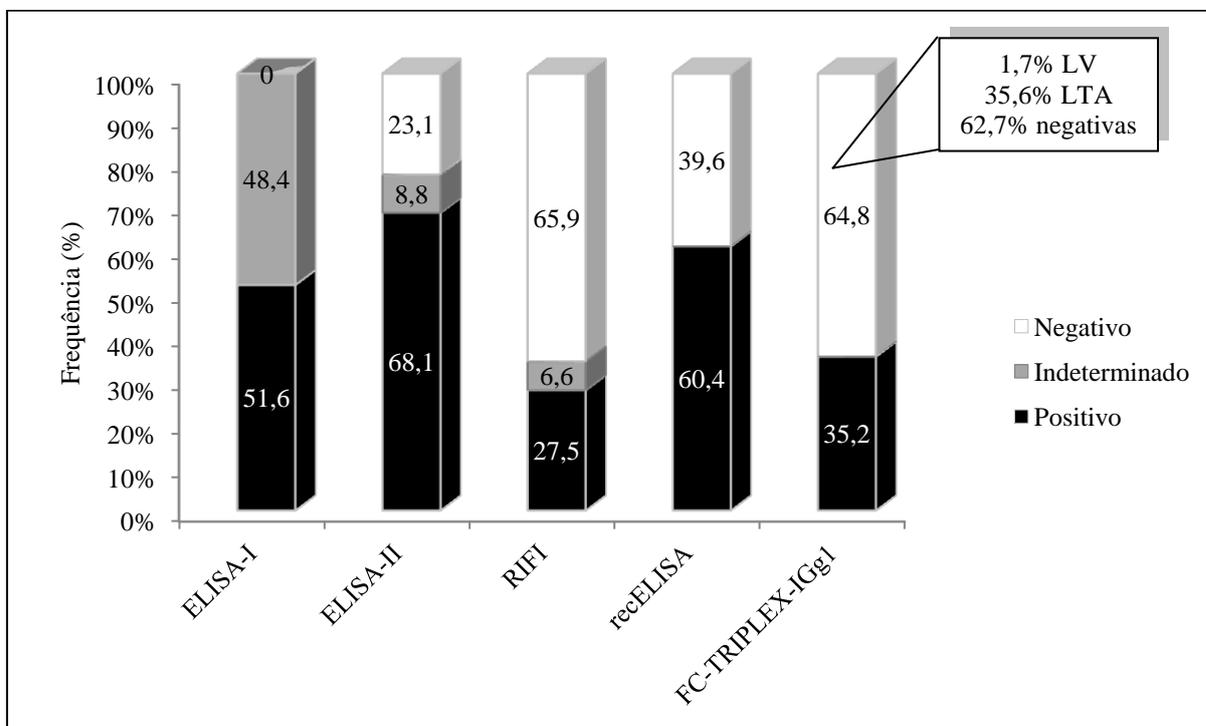


Figura 24: Resultados dos testes de triagem e dos métodos confirmatórios para diagnóstico da doença de Chagas realizados no estudo.

6.1.3.1 Avaliação dos métodos confirmatórios segundo o consenso do Ministério da Saúde para diagnóstico da doença de Chagas

Considerando a recomendação do Ministério da Saúde para o diagnóstico da doença de Chagas, que sugere a realização de um teste de triagem, geralmente ELISA e, em caso de resultado positivo, que outro teste de princípio diferente seja realizado, geralmente RIFI, foi feita uma análise comparativa dos testes confirmatórios de acordo com os resultados ELISA/RIFI. Assim, do total de amostras estudadas, 38/91 (41,8%) tiveram resultados concordantes entre a RIFI e pelo menos um dos testes ELISA (I e II), sendo 23/38 (60,5%) ELISA+RIFI+ e 15/38 (39,5%) ELISA-RIFI-.

Das amostras ELISA+RIFI+, 17/23 (73,9%) foram positivas no FC-TRIPLEX-IgG1 e no recELISA. Das 6 amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, 3 apresentaram resultado positivo para leishmaniose e 4 foram também negativas no recELISA. Já nas amostras

ELISA-RIFI-, 14/15 (93,3%) também foram negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, porém nenhuma delas 0/15 (0,0%) foi negativa no recELISA. Os resultados estão representados na Figura 25.

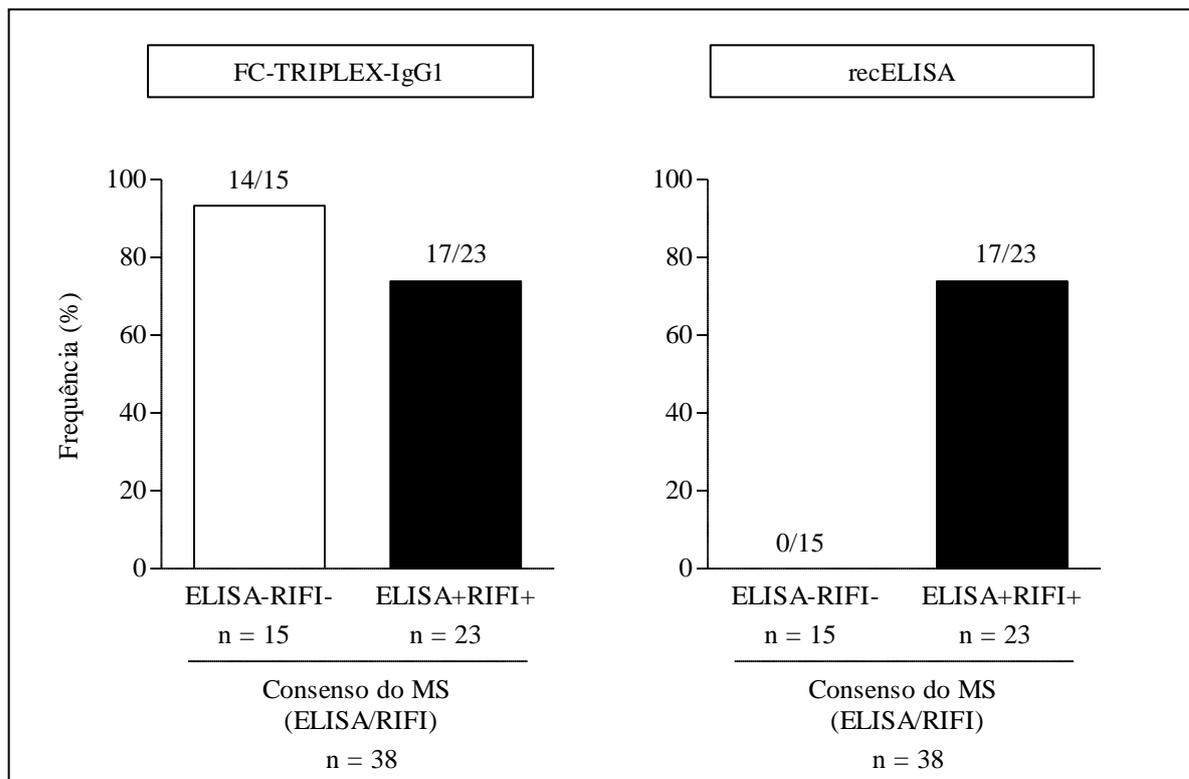


Figura 25: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios *versus* testes de triagem de acordo com o consenso do Ministério da Saúde para o diagnóstico da doença de Chagas.

6.1.4 Comparação da reatividade dos testes de triagem e dos métodos confirmatórios

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados dos testes sorológicos de triagem para doença de Chagas realizados no estudo comparados aos observados nos métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1. Foram mostrados os resultados “falso-positivos” e “falso-negativos” das técnicas de triagem considerando os resultados dos métodos confirmatórios, bem como a concordância entre os testes.

De acordo com o índice kappa, o teste que apresentou maior concordância com o FC-TRIPLEX-IgG1 foi a RIFI, seguido do ELISA-I, recELISA e ELISA-II. A concordância da nova metodologia foi ainda maior quando se associam os testes ELISA/RIFI.

O teste que apresentou maior concordância com o recELISA foi o ELISA-I, seguido do FC-TRIPLEX-IgG1, ELISA-II, RIFI, ELISA/RIFI. No entanto, a concordância do

recELISA com cada um dos métodos de triagem foi inferior à do FC-TRIPLEX-IgG1 com os mesmos métodos.

Tabela 2: Casos positivos, negativos e concordância de cada técnica de triagem comparados aos resultados do método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1.

Testes sorológicos para doença de Chagas		FC-TRIPLEX-IgG1		Índice kappa (grau de concordância)	Valor p
		P	N		
ELISA-I n = 91	P	28	19	0,5 (moderada)	< 0,0001
	N/I	4	40		
ELISA-II n = 91	P	26	36	0,2 (falha)	0,0607 (ns)
	N/I	6	23		
RIFI n = 91	P	18	7	0,5 (moderada)	< 0,0001
	N/I	14	52		
ELISA/RIFI n = 38	P	17	6	0,6 (boa)	< 0,0001
	N	1	14		
recELISA n = 91	P	25	30	0,2 (falha)	0,0137
	N	7	29		

P: resultado positivo; N: resultado negativo; I: resultado indeterminado; ns: não significativo.

Tabela 3: Casos positivos, negativos e concordância de cada técnica de triagem comparados aos resultados do método confirmatório recELISA.

Testes sorológicos para doença de Chagas		recELISA		Índice kappa (grau de concordância)	Valor p
		P	N		
ELISA-I n = 91	P	33	14	0,2 (falha)	0,0565 (ns)
	N/I	22	22		
ELISA-II n = 91	P	37	25	-0,02 (nula)	1,000 (ns)
	N/I	18	11		
RIFI n = 91	P	17	8	0,08 (pobre)	0,4728 (ns)
	N/I	38	28		
ELISA/RIFI n = 38	P	17	6	-0,3 (nula)	0,0634 (ns)
	N	15	0		
FC-TRIPLEX-IgG1 n = 91	P	25	7	0,2 (falha)	0,0137
	N	30	29		

P: resultado positivo; N: resultado negativo; I: resultado indeterminado; ns: não significativo.

Com base nos resultados dos três testes sorológicos realizados para triagem da doença de Chagas, ELISA-I, ELISA-II e RIFI, as amostras foram classificadas como positivas (POS_T) e discordantes (DISC_T). Das amostras que compõem este estudo, 20/91 (22,0%) foram classificadas como POS_T por apresentarem resultados persistentemente reativos nos três testes

de triagem e 71/91 (78,0%) foram classificadas como DISC_T por apresentarem incompatibilidade nos resultados em pelo menos um dos testes de triagem realizados.

Das amostras classificadas como POS_T, tanto o recELISA quanto o FC-TRIPLEX-IgG1 confirmaram como positivas 16/20 (80,0%) amostras. Das 4 amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, uma apresentou resultado positivo para LV e uma para LT.

Das amostras classificadas como DISC_T, 25/71 (35,2%) foram positivas em dois testes de triagem, 24/71 (33,8%) foram positivas em apenas um teste de triagem e 22/71 (31,0%) foram indeterminadas ou negativas, não apresentando resultado positivo em nenhum dos testes de triagem realizados.

Das amostras que apresentaram resultado positivo em dois testes de triagem, 15/25 (60,0%) foram confirmadas como positivas pelo recELISA e 11/25 (44,0%) pelo FC-TRIPLEX-IgG1. Dentre as amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, 6 apresentaram resultado positivo para LT.

Das amostras que apresentaram resultado positivo em apenas um teste de triagem, 9/24 (37,5%) foram confirmadas como positivas pelo recELISA e 2/24 (8,3%) pelo FC-TRIPLEX-IgG1. Dentre as amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, 10 apresentaram resultado positivo para LT.

Das amostras que não apresentaram resultado positivo em nenhum dos testes de triagem, apenas indeterminado ou negativo, 15/22 (68,2%) foram positivas no recELISA e 3/22 (13,6%) no FC-TRIPLEX-IgG1. Dentre as amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, 4 apresentaram resultado positivo para LT.

Assim, do total de amostras DISC_T, 39/71 (54,9%) foram confirmadas como positivas pelo recELISA e 16/71 (22,5%) pelo FC-TRIPLEX-IgG1. Dentre as amostras negativas para doença de Chagas no FC-TRIPLEX-IgG1, 20 apresentaram resultado positivo para LT.

Na Tabela 4, as amostras foram agrupadas conforme a quantidade de resultados positivos nos testes de triagem. Foi comparada a reatividade dos testes de triagem ELISA-I, ELISA-II e RIFI em relação aos métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1 para as 91 amostras de soro que compõem este estudo.

Tabela 4: Reatividade comparativa em testes de triagem *versus* métodos confirmatórios em amostras não negativas na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.

Classificação das amostras	Testes de triagem			Número de amostras (%)	Métodos confirmatórios			
	ELISA-I	ELISA-II	RIFI		recELISA positivo	FC-TRIPLEX-IgG1 positivo		
						DC	LV	LT
POS _T	P	P	P	20	16	16	1	1
	3 Resultados Positivos			20 (22,0%)	16	16	1	1
	P	P	N/I	22	14	10	0	5
	N/I	P	P	2	1	0	0	1
DISC _T	P	N/I	P	1	0	1	0	0
	2 Resultados Positivos			25 (27,4%)	15	11	0	6
	P	N/I	N/I	4	3	1	0	1
	N/I	P	N/I	18	6	0	0	8
	N/I	N/I	P	2	0	1	0	1
	1 Resultado Positivo			24 (26,4%)	9	2	0	10
	N/I	N/I	N/I	22	15	3	0	4
0 Resultados Positivos			22 (24,2%)	15	3	0	4	
Total				91 (100%)	55	32	1	21

POS_T: resultados positivos na triagem; DISC_T: resultados discordantes na triagem; P: resultado positivo; N: resultado negativo; I: resultado indeterminado.

6.1.5 Comparação da reatividade dos métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1

Para comparação dos métodos confirmatórios FC-TRIPLEX-IgG1 e recELISA, foram analisados os resultados destes testes no total de amostras e nos subgrupos criados após a realização dos três testes de triagem para doença de Chagas. Do total de amostras (TOTAL_T), 32/91 (35,2%) foram positivas no FC-TRIPLEX-IgG1 e 55/91 (60,4%) foram positivas no recELISA, sendo a diferença de positividade estatisticamente significativa ($p = 0,001$). Do subgrupo de amostras classificadas como discordantes (DISC_T), 16/71 (22,5%) foram positivas no FC-TRIPLEX-IgG1 e 39/71 (54,9%) foram positivas no recELISA, sendo a diferença de positividade estatisticamente significativa ($p = 0,0001$). Do subgrupo de amostras classificadas como positivas (POS_T), 16/20 (80,0%) foram positivas tanto no FC-TRIPLEX-IgG1 quanto no recELISA.

Os resultados estão representados na Figura 26.

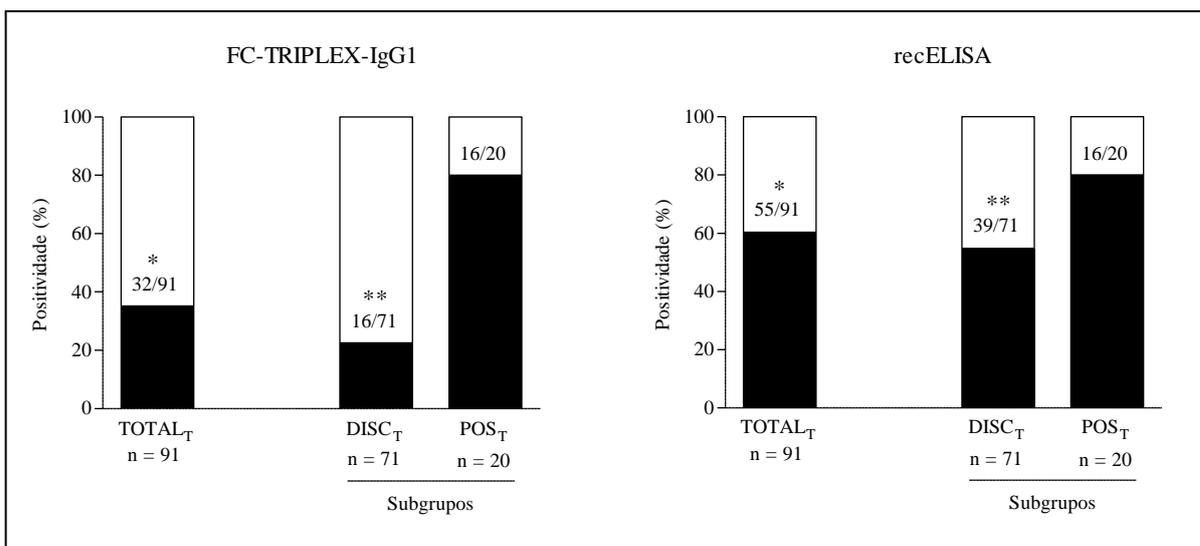


Figura 26: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados não negativos na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.
* $p = 0,001$; ** $p = 0,0001$.

A concordância entre os testes confirmatórios FC-TRIPLEX-IgG1 e recELISA também foi verificada para todas as amostras e para cada subgrupo, como mostrado na Figura 27. No TOTAL_T de amostras, a concordância foi considerada falha ($k = 0,2$), com 29/91 (31,9%) amostras negativas e 25/91 (27,5%) positivas em ambos os testes, sendo discordantes os resultados em 37/91 (40,6%) amostras. Já no subgrupo DISC_T, a concordância foi considerada pobre ($k = 0,1$), com 26/71 (36,6%) amostras negativas e 10/71 (14,1%) positivas em ambos os testes, sendo discordantes os resultados em 35/71 (49,3%) amostras. Por fim, no subgrupo POS_T, a concordância foi considerada boa ($k = 0,7$), com 3/20 (15,0%) amostras negativas e 15 (75,0%) positivas em ambos os testes, sendo discordantes os resultados em apenas 2/20 (10,0%) amostras.

Portanto, os testes confirmatórios tiveram menor concordância entre os resultados do subgrupo de amostras DISC_T, que também apresenta resultados discordantes nos testes de triagem realizados neste estudo.

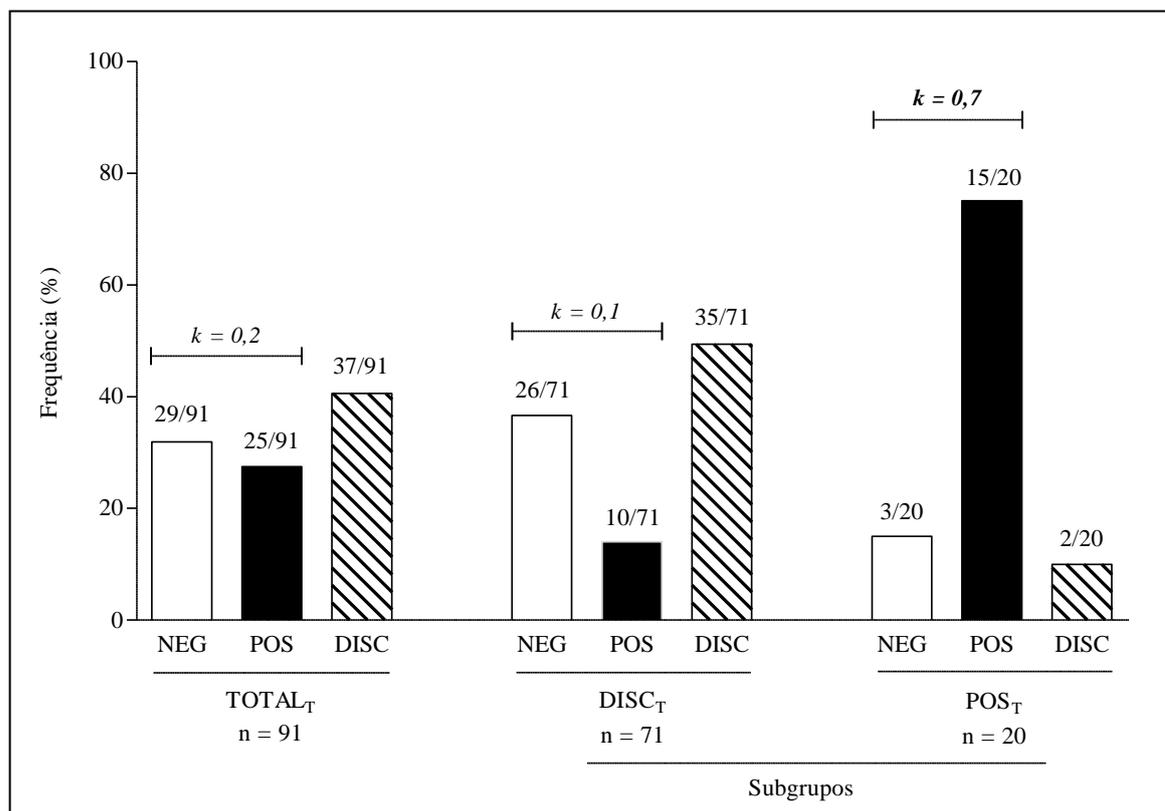


Figura 27: Concordância entre os métodos confirmatórios FC-TRIPLEX-IgG1 e recELISA no esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.

6.1.5.1 Reatividade dos métodos confirmatórios em relação aos testes de triagem no grupo de amostras DISC_T

Como a comparação dos métodos confirmatórios FC-TRIPLEX-IgG1 e recELISA mostrou que eles apresentam desempenhos diferentes e baixa concordância nas amostras do subgrupo DISC_T, os resultados de cada um destes métodos foram comparados aos dos testes convencionais utilizados para triagem da doença de Chagas.

No diagrama da Figura 28 é possível visualizar a reatividade do FC-TRIPLEX-IgG1 em relação aos testes de triagem para as amostras DISC_T (n = 71). Já o gráfico (Figura 28) representa apenas as amostras positivas no FC-TRIPLEX-IgG1 para cada um dos testes de triagem realizados.

No ELISA-I, nenhuma amostra apresentou resultado negativo, apenas indeterminado e positivo. Das amostras com resultado indeterminado neste teste, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 4/44 (9,1%); e das amostras com resultado positivo, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 12/27 (44,4%). A diferença da positividade do FC-TRIPLEX-IgG1 entre as amostras indeterminadas e positivas no ELISA-I foi estatisticamente significativa (p = 0,0003).

No ELISA-II, das amostras com resultado negativo, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 5/21 (23,8%); das amostras com resultado indeterminado, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 1/8 (12,5%); e das amostras com resultado positivo, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 10/42 (23,8%). A diferença da positividade do FC-TRIPLEX-IgG1 entre as amostras negativas, indeterminadas e positivas no ELISA-II não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Na RIFI, das amostras com resultado negativo, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 10/60 (16,7%); das amostras com resultado indeterminado, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 4/6 (66,7%); e das amostras com resultado positivo, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 2/5 (40,0%). A diferença da positividade do FC-TRIPLEX-IgG1 entre as amostras negativas e indeterminadas na RIFI foi estatisticamente significativa ($p = 0,0021$).

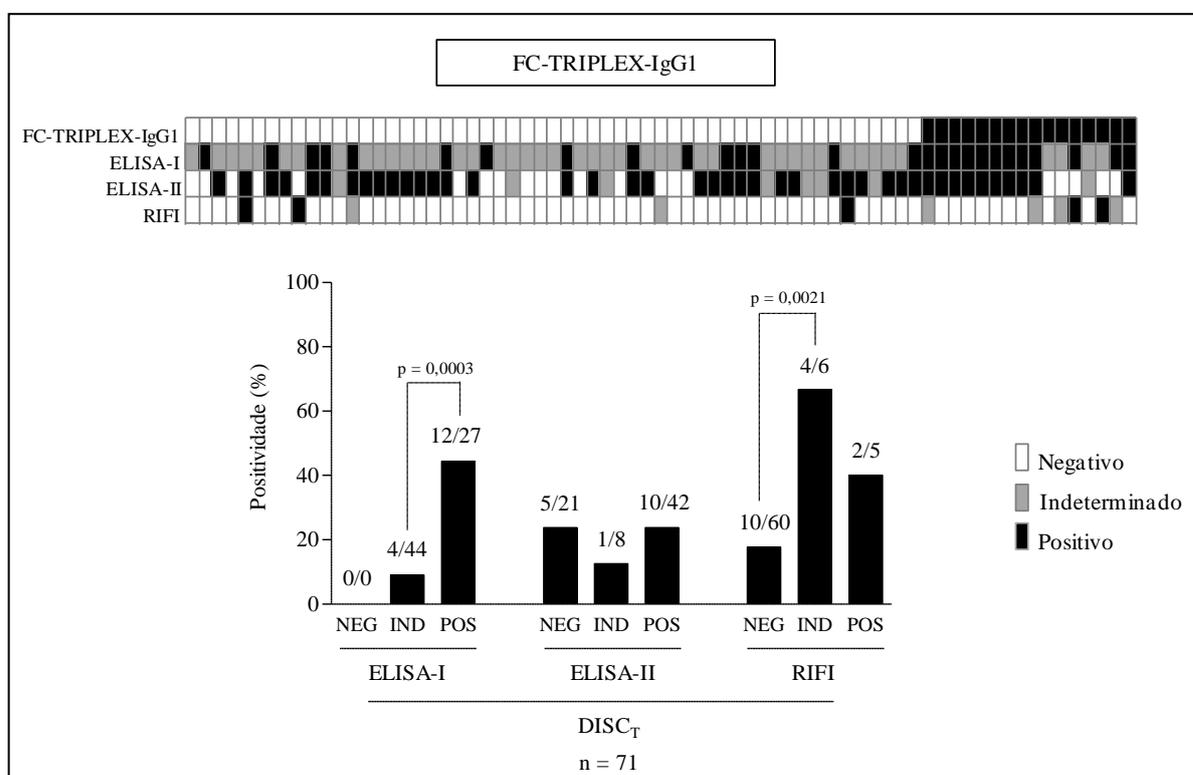


Figura 28: Reatividade comparativa no método confirmatório FC-TRIPLEX-IgG1 *versus* testes de triagem no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados $DISC_T$ para doença de Chagas em bancos de sangue.

Da mesma forma como realizado para o FC-TRIPLEX-IgG1, foi construído o diagrama abaixo para visualização da reatividade do recELISA em relação aos testes de triagem para as amostras $DISC_T$ ($n = 71$). Já o gráfico representa apenas as amostras positivas no recELISA para cada um dos testes de triagem realizados (Figura 29).

No ELISA-I, nenhuma amostra apresentou resultado negativo, apenas indeterminado e positivo. Das amostras com resultado indeterminado, o recELISA foi positivo em 22/44 (50,0%); e das amostras com resultado positivo, o recELISA foi positivo em 17/27 (63,0%). A diferença da positividade do recELISA entre as amostras indeterminadas e positivas no ELISA-I não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

No ELISA-II, das amostras com resultado negativo, o recELISA foi positivo em 16/21 (76,2%); das amostras com resultado indeterminado, o recELISA foi positivo em 2/8 (25,0%); e das amostras com resultado positivo, o recELISA foi positivo em 21/42 (50,0%). A diferença da positividade do recELISA entre as amostras negativas e indeterminadas no ELISA-II foi estatisticamente significativa ($p = 0,0056$), bem como entre as amostras negativas e positivas ($p = 0,0233$).

Na RIFI, das amostras com resultado negativo, o recELISA foi positivo em 35/60 (58,3%); das amostras com resultado indeterminado, o recELISA foi positivo em 3/6 (50,0%); e das amostras com resultado positivo, o recELISA foi positivo em 1/5 (20,0%). A diferença da positividade do recELISA entre as amostras negativas e positivas na RIFI foi estatisticamente significativa ($p = 0,0488$).

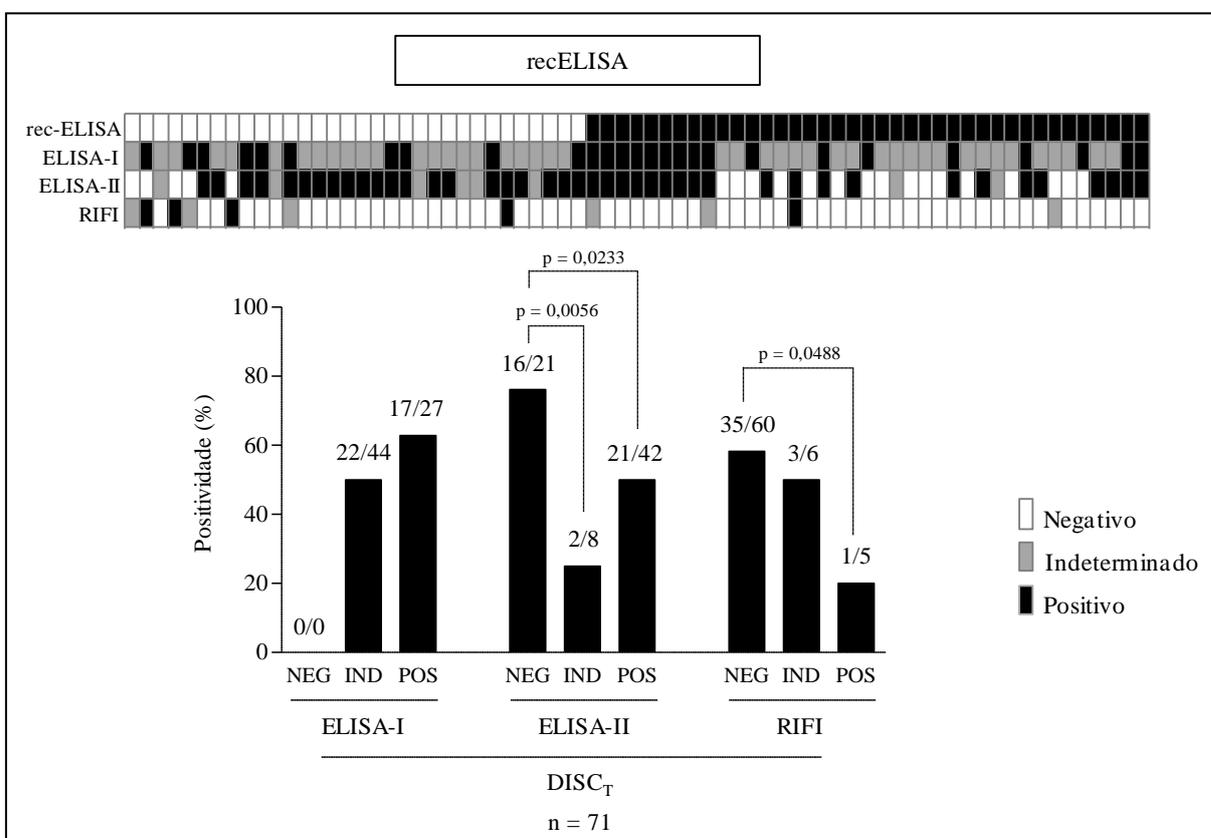


Figura 29: Reatividade comparativa no método confirmatório recELISA *versus* testes de triagem no esclarecimento diagnóstico de amostras com resultados DISC_T para doença de Chagas em bancos de sangue.

6.1.5.2 Reatividade diferencial do FC-TRIPLEX-IgG1 comparada à reatividade do recELISA em amostras DISC_T

A fim de verificar a existência de reação cruzada com antígenos de *Leishmania* spp., fato que poderia explicar o grande número de resultados positivos no recELISA em relação aos outros testes feitos neste estudo, foi utilizado o recurso do FC-TRIPLEX-IgG1 de realizar o diagnóstico diferencial da doença de Chagas e das leishmanioses, o que constitui uma das grandes vantagens do método. Assim, foi analisada a reatividade diferencial das amostras DISC_T (n = 71) no FC-TRIPLEX-IgG1 (Figura 30) e os resultados foram comparados à reatividade no recELISA (Figura 31).

Considerando os resultados do FC-TRIPLEX-IgG1 para as amostras DISC_T, 16/71 (22,5%) foram positivas para doença de Chagas, 0/71 (0,0%) foi positiva para leishmaniose visceral, 20/71 (28,2%) foram positivas para leishmaniose tegumentar e 35/71 (49,3%) foram negativas para as três doenças.

Das amostras positivas para doença de Chagas no FC-TRIPLEX-IgG1, 6/16 (37,5%) foram negativas e 10/16 (62,5%) foram positivas para doença de Chagas no recELISA. Já das amostras positivas para leishmaniose tegumentar no FC-TRIPLEX-IgG1, 13/20 (65,0%) foram negativas e 7/20 (35,0%) foram positivas para doença de Chagas no recELISA. Por fim, das amostras negativas para as três doenças no FC-TRIPLEX-IgG1, 13/35 (37,1%) foram negativas e 22/35 (62,9%) foram positivas para doença de Chagas no recELISA.

Assim, de 55/71 (77,5%) amostras negativas no FC-TRIPLEX-IgG1 para doença de Chagas, o recELISA foi positivo em 29/71 (40,8%). A elevada positividade para doença de Chagas observada no recELISA ocorreu principalmente entre as amostras com resultado negativo para as três doenças no FC-TRIPLEX-IgG1: 22/35 amostras (62,9%). Destas amostras positivas no recELISA porém negativas no FC-TRIPLEX-IgG1, 21/22 (95,5%) foram negativas e 1/22 (4,5%) foi indeterminada na RIFI, enquanto nos testes ELISA-I e ELISA-II, elas apresentaram resultados predominantemente negativos e indeterminados.

Estes resultados podem ser visualizados nos gráficos da Figura 30 e da Figura 31.

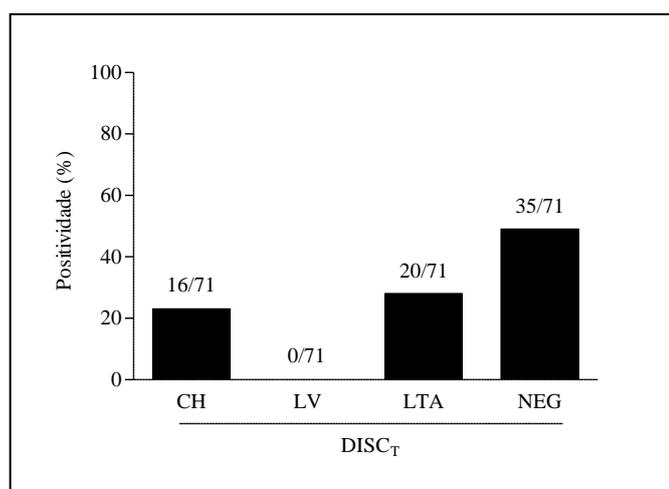


Figura 30: Reatividade diferencial no método FC-TRIPLEX-IgG1 em amostras com resultados discordantes ($DISC_T$) em testes de triagem para doença de Chagas em bancos de sangue.

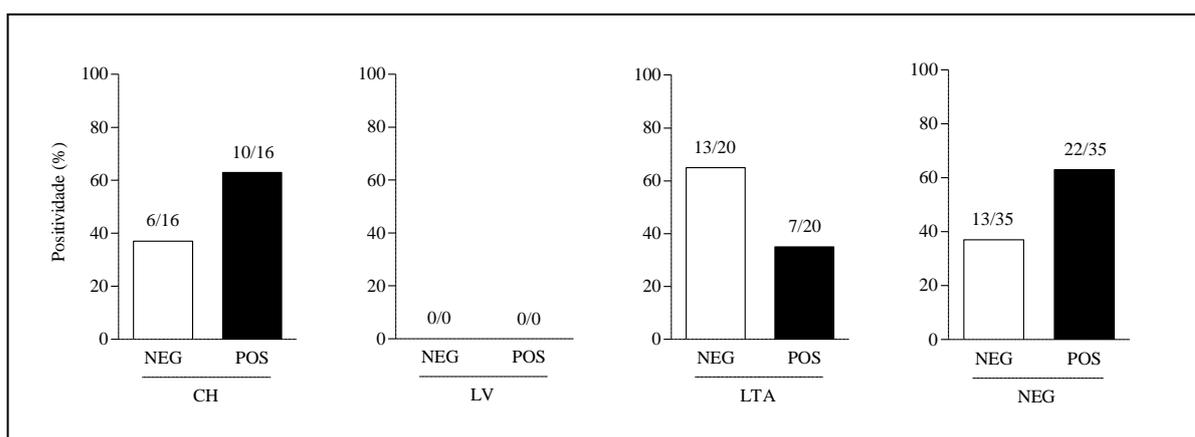


Figura 31: Reatividade no método recELISA nos subgrupos identificados no FC-TRIPLEX-IgG1.

6.2 Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem

As amostras de soro deste estudo foram coletadas em 2009 e pertencem a candidatos à doação de sangue que apresentaram resultado não negativo na triagem sorológica para doença de Chagas realizada há 10 anos (1999) na Fundação PRÓ-SANGUE.

Após a retestagem das amostras utilizando os testes convencionais para triagem ELISA (Biomérieux) e RIFI (Biomérieux), foram selecionadas para este estudo as amostras com resultados ELISA-RIFI- ($n = 50$) e ELISA+RIFI+ ($n = 50$), sendo os métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1 realizados em todas as amostras ($n = 100$).

Para verificar o desempenho comparativo dos métodos confirmatórios em relação aos testes de triagem ELISA/RIFI, foi construído o gráfico abaixo (Figura 32). Do total de amostras estudadas, 47/100 (47,0%) apresentaram soropositividade persistente e 49/100 (49,0%) apresentaram resultado negativo em todos os métodos testados, tanto os de triagem quanto os confirmatórios.

No FC-TRIPLEX-IgG1, 49/50 amostras ELISA-RIFI- foram negativas (98% de concordância), enquanto 47/50 amostras ELISA+RIFI+ foram positivas (94% de concordância). Apenas uma amostra foi positiva para LT no FC-TRIPLEX-IgG1, sendo ela negativa para doença de Chagas tanto no ELISA/RIFI quanto no recELISA.

Já o recELISA teve 100% de concordância com os testes ELISA/RIFI, tanto nas amostras com resultado negativo quanto nas amostras com resultado positivo.

Assim, houve uma boa concordância entre os métodos e, em geral, as amostras negativas em ambos os testes de triagem foram também negativas em ambos os métodos confirmatórios, o que igualmente se aplica às amostras positivas.

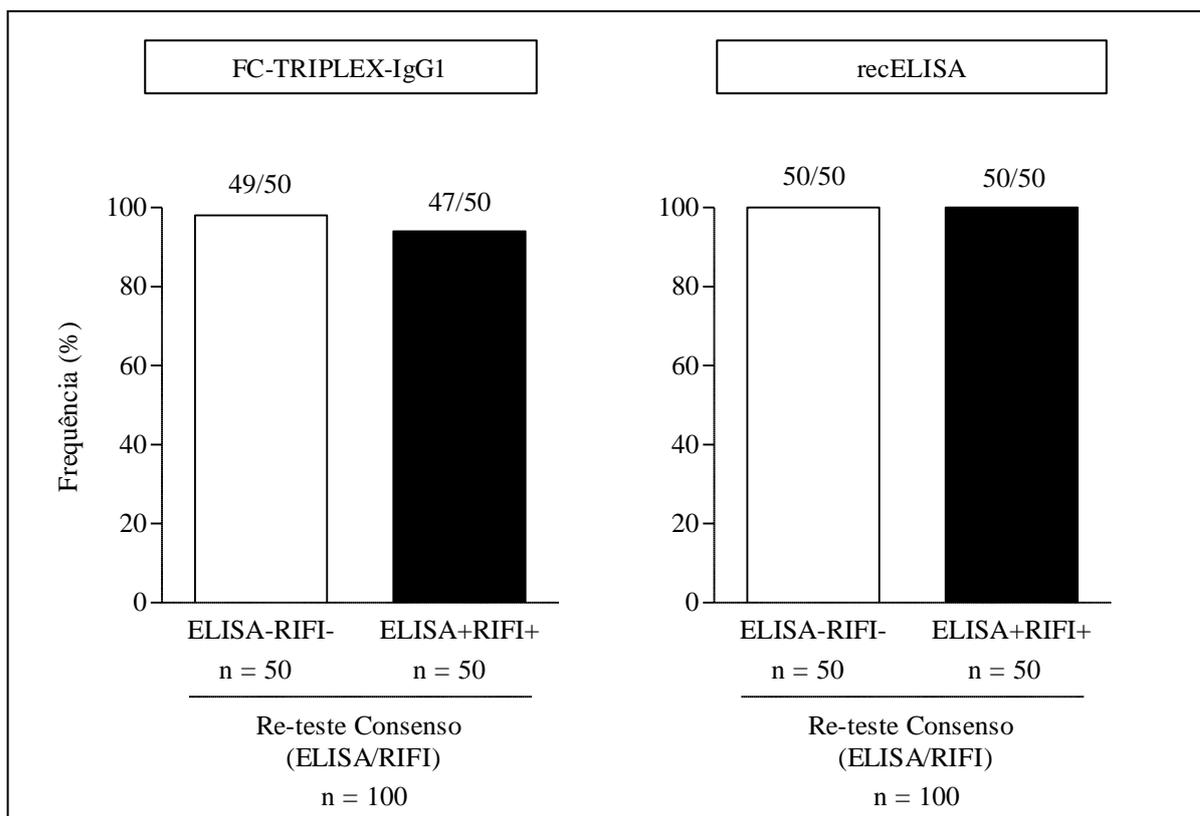


Figura 32: Reatividade comparativa em métodos sorológicos confirmatórios *versus* testes de triagem na monitoração sorológica de doadores com antecedente de não negatividade para doença de Chagas em bancos de sangue.

7 DISCUSSÃO

7.1 Estudo sobre esclarecimento diagnóstico

A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública na realidade brasileira. Frente ao maior controle da transmissão vetorial da doença, a transfusão sanguínea tem adquirido enorme relevância epidemiológica, sendo considerada a principal via de transmissão do *T. cruzi* na zona urbana, onde residem aproximadamente 70% da população (Dias, 2009). Por isso, a triagem de potenciais doadores é obrigatória desde 1969 no Brasil e a utilização rotineira dos testes sorológicos em unidades hemoterápicas tem contribuído de forma decisiva para a redução do número de casos pós-transfusionais da infecção pelo *T. cruzi* (MS, 2004a).

Em Minas Gerais, 16,6% dos doadores eram chagásicos na década de 1960 e em 2005 apenas 0,3% dos doadores foram inaptos sorológicos para esta endemia (Moraes-Souza et al., 2006a). Estudos realizados em Pernambuco mostraram soroprevalência entre doadores de 4,4% na década de 1970 e de 0,2% no ano de 2008, indicando que houve um decréscimo médio de 55 doadores soropositivos por ano (Melo et al., 2009). Em São Paulo, esta prevalência era de 2,9% no início da década de 1980 e passou a ser de 0,2% em 2003 (Salles et al., 2003).

No ano de 2002, a taxa de inaptidão sorológica por doença de Chagas entre doadores brasileiros foi de 0,61% (MS, 2002). Já em 2005, esta taxa reduziu para 0,21% (OPAS, 2006) e em 2010 chegou a 0,17% (MS, 2011). Neste estudo, de todas as doações de sangue recebidas pelos hemocentros participantes (localizados em Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo) no período de coleta das amostras (2007 e 2008), 0,14% foram consideradas inaptas por apresentarem sorologia não negativa na triagem para doença de Chagas. Estes dados indicam a redução da soroprevalência desta doença entre os doadores e, conseqüentemente, a diminuição significativa do descarte de bolsas de sangue que, ainda assim, é significativamente maior do que o observado em países desenvolvidos (Ownby et al., 1997).

A forte tendência de diminuição da inaptidão sorológica devido à doença de Chagas em hemocentros nos últimos anos provavelmente é consequência de fatores como o combate sistemático ao principal vetor (*T. infestans*) no Brasil desde a década de 1970 e à atuação mais efetiva da vigilância sanitária nos serviços de hemoterapia, com alta cobertura sorológica de doadores e aumento no número de doadores de repetição (de Lima et al., 2012).

Paralelamente à baixa prevalência de doadores chagásicos, vem chamando atenção a proporção significativa de inaptidão sorológica em decorrência de reações inconclusivas, indeterminadas ou discrepantes. Estudos desenvolvidos no Brasil mostraram índices de reações inconclusivas e/ou discrepantes variando entre 53% e 69,6% dos inaptos sorológicos (Salles et al., 1996; Moraes-Souza et al., 2006b; Melo et al., 2009).

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas é difícil, tanto em laboratórios clínicos quanto em laboratórios de triagem, pois não há uma técnica de referência considerada padrão-ouro para confirmação dos resultados da triagem. Apesar do desenvolvimento de novas metodologias ao longo das últimas duas décadas e do aprimoramento dos métodos disponíveis para diagnóstico indireto – especialmente ELISA, HAI e RIFI –, os testes não apresentam o desempenho esperado, tendo níveis variados de sensibilidade e especificidade. Por isso, os resultados obtidos por meio de técnicas diferentes, e até mesmo considerando a mesma metodologia, frequentemente se apresentam discordantes (Blejer et al., 1999; Pirard et al., 2005; Malan et al., 2006).

As amostras do estudo foram triadas por testes amplamente utilizados na rotina laboratorial, ELISA e RIFI, que possuem sensibilidade e especificidade média de 99%, como demonstrado pelos fabricantes e em vários estudos (Carvalho et al., 1993; Flores-Chávez et al., 2010; MS, 2010b). A RIFI é o método de escolha para o diagnóstico da doença de Chagas em não doadores, sobretudo quando os títulos são elevados ($>1/80$). No entanto, ela não é passível de automação e a interpretação dos resultados depende do operador, o que a torna muito trabalhosa para ser utilizada em grandes rotinas de triagem de doadores. Além disso, é freqüente a ocorrência de reação cruzada com outros tripanosomatídeos, o que pode ser observado principalmente em títulos inferiores a 1/40. Por isso, o ELISA é o método de escolha para triagem sorológica de doadores de sangue e a história epidemiológica do doador deve ser sempre considerada (MS, 2004a).

Apesar do bom desempenho da maioria dos kits comerciais, ainda são descritas muitas falhas principalmente em relação à especificidade destes testes. Neste estudo, tanto comparando a mesma metodologia (ELISA-I e ELISA-II), quanto – e principalmente – na comparação do ELISA com a RIFI, os resultados foram diferentes para a maioria das amostras e 78,0% delas apresentaram resultados discordantes ($DISC_T$) em pelo menos um dos três testes de triagem realizados. Resultados inconclusivos são comumente relatados e tem sido sistematicamente descritos e analisados por muitos grupos com diferentes conclusões em relação à interpretação desses padrões de reatividade (Salles et al., 1996; Leiby et al., 2000; Otani et al., 2009).

Em um estudo realizado no sul do Brasil por Araújo e Berne (2013), cujo objetivo foi comparar diferentes testes comerciais utilizados para o sorodiagnóstico da doença de Chagas, 34,16% das amostras apresentaram incompatibilidade nos resultados em pelo menos um dos testes realizados. A taxa de discordância encontrada em nosso estudo foi muito superior ao relatado pelos autores, o que provavelmente se deve ao fato de que a amostragem foi feita por conveniência, sendo composta por apenas 10% das amostras já classificadas como não negativas na triagem realizada pelos hemocentros. Por isto, as amostras estudadas não são representativas de todas as doações realizadas no período de coleta das amostras.

A grande discordância existente entre os resultados dos testes sorológicos para diagnóstico da doença de Chagas, quando são realizadas várias técnicas em uma mesma amostra, também foi observada por vários autores (Bracho et al., 1998; Blejer et al., 1999; Sánchez et al., 2001; Sánchez-Guillén, 2002; Pirard et al., 2005; Malan et al., 2006; de Marchi et al., 2007; Picka et al., 2007; Araújo et al., 2008; Furuchó et al., 2008; Otani et al., 2009; Araújo e Berne, 2013). Remesar et al. (2009) mostraram que de 20% das doações de sangue descartadas devido a reatividade para doença de Chagas na triagem sorológica realizada em uma área endêmica na Argentina, um terço (6% do total de doações) tinha resultado inconclusivo baseado na combinação de resultados de diferentes testes.

Todas as técnicas utilizadas no estudo de Araújo e Berne (2013) apresentaram falhas na sensibilidade e especificidade em comparação ao método confirmatório TESA-blot (Trypomastigote excreted-secreted antigen-blot), considerando a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos: o ELISA convencional apresentou alta sensibilidade, com poucos resultados falso-negativos, enquanto a RIFI apresentou menor sensibilidade, com maior taxa de falso-negativos.

Da mesma forma, estudos realizados por Lorca et al. (1994) e Teixeira et al. (1994) também mostraram que a elevada sensibilidade do ELISA é constante, porém sua especificidade é variável. Em relação a RIFI, Luquetti e Rassi (2000) observaram que, embora a maioria (76%) dos soros de pacientes chagásicos apresentem títulos de 1:640 ou superior na RIFI, sendo raros aqueles com títulos inferiores a 1:160 (1,4%), amostras provenientes da triagem em bancos de sangue em geral apresentam reatividade duvidosa (1:20 a 1:40), não acompanhada de positividade nos outros testes. É importante salientar, ainda, que a subjetividade da técnica de leitura da RIFI pode causar variação de interpretação em amostras com resultados fracamente reativos.

Em nosso estudo, tanto o ELISA realizado para triagem nos hemocentros (ELISA-I) quanto o realizado como teste de triagem complementar (ELISA-II) apresentaram altas taxas

de positividade, de 51,6% e 68,1%, respectivamente. Na RIFI, apenas 27,5% dos resultados foi positivo (título médio de 1:160). Estes resultados parecem corroborar o estudo acima citado em relação à alta sensibilidade do ELISA e a menor sensibilidade da RIFI. Entretanto, como não há um método sorológico padrão-ouro para confirmar a infecção pelo *T. cruzi* e as amostras do nosso estudo são provenientes de bancos de sangue, onde não é realizado diagnóstico parasitológico para doença de Chagas, não é possível calcular estes parâmetros, visto que eles se baseiam em verdadeiros positivos e verdadeiros negativos.

A elevada sensibilidade do ELISA, método recomendado pela ANVISA para a triagem sorológica de doadores em hemocentros (MS, 2004b), permite que ele detecte os resultados verdadeiramente positivos, aumentando a segurança transfusional. Por outro lado, sua menor especificidade produz resultados falso-positivos, o que faz com que muitas bolsas de sangue sejam desnecessariamente descartadas, comprometendo o suprimento de sangue dos hemocentros, além de causar consequências sociais e psicológicas ao doador inapto, que acredita ser portador de uma doença crônica grave. Sabino et al. (2010) realizaram três testes complementares em amostras já reativas ou indeterminadas na triagem sorológica para doença de Chagas em hemocentros e verificaram que 60% das amostras foram negativas em todos os três testes, sendo consideradas falso-positivas na triagem e, portanto, descartadas de forma desnecessária.

Em nossos dados foi possível observar também um alto número de resultados indeterminados, que no ELISA-I chegou a 48,4% das amostras, enquanto no ELISA-II e na RIFI esta taxa foi próxima, sendo de 8,8% e 6,6%, respectivamente. Segundo Ferreira-Silva et al. (2010), os resultados inconclusivos ou indeterminados para doença de Chagas podem representar mais de 50% das reações não negativas na triagem sorológica de doadores e no Hemocentro Regional de Uberaba, por exemplo, eles representaram 52% das inaptidões para doação no período de 2000 a 2005. Já no hemocentro do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), esta taxa foi de 37% no período de 2004 a 2007 (Cogo et al., 2014).

A alta frequência de resultados indeterminados é, atualmente, um dos maiores desafios enfrentados pelos bancos de sangue na triagem sorológica para doença de Chagas, especialmente quando mais de um teste é realizado. Estes resultados não afetam apenas o aconselhamento e condução dos doadores nesta situação, mas também a estimativa das taxas de prevalência e incidência da doença pela vigilância epidemiológica e podem até mesmo comprometer o suprimento de sangue nos hemocentros, além de impedir futuras doações e dificultar a avaliação da performance de novos testes diagnósticos (Sabino et al., 2010).

As amostras inconclusivas podem representar casos de reação cruzada com outras infecções parasitárias, infecções auto-limitadas com declínio de anticorpos ou doença de Chagas ativa com baixo nível de resposta de anticorpos ou com anticorpos não detectados pelos ensaios empregados. Neste último caso, a falha na detecção da infecção em doadores pode implicar em transmissão do *T. cruzi* por transfusão sanguínea (Sabino et al., 2010).

A variação na performance dos testes disponíveis, as dificuldades encontradas no manejo de doadores com reações inconclusivas e o significativo descarte, possivelmente desnecessário, de bolsas de sangue evidenciam a necessidade de implementar estratégias que permitam minimizar e esclarecer os resultados sorológicos duvidosos. Neste sentido, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver testes confirmatórios de alto desempenho que possam ser utilizados na rotina de bancos de sangue, visando definir com segurança o perfil sorológico dos doadores (Moraes-Souza et al., 2006a; Ferreira-Silva et al., 2010; Flores-Chávez et al., 2010; Sabino et al., 2010).

Assim, muitos pesquisadores vêm aprimorando a técnica de ELISA por meio da substituição dos antígenos de epimastigota do *T. cruzi* pela mistura de antígenos recombinantes obtidos por processos de biologia molecular. Os antígenos são provenientes de proteínas específicas tanto de epimastigotas, forma encontrada nas culturas *in vitro*, quanto de tripomastigotas, forma presente na infecção humana. Este é o caso da técnica recELISA e esta substituição amplia as perspectivas diagnósticas, geralmente fazendo com que o teste tenha maior especificidade e, em alguns casos, maior sensibilidade (Saez-Alquezar et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Berrizbietia et al., 2004; Umezawa et al., 2004; Gutierrez et al., 2004; MS, 2004a; Aguirre et al., 2006; da Silva, 2011). Segundo Sabino et al. (2010), o teste confirmatório recELISA propõe a diminuição da reação cruzada com soros positivos para Leishmania, enquanto conserva a sensibilidade para o *T. cruzi* similar a outros testes ELISA e aos ensaios de radioimunoprecipitação.

A metodologia FC-TRIPLEX-IgG1, por sua vez, também surgiu como uma inovação no diagnóstico não apenas da doença de Chagas, mas também das leishmanioses. Trata-se de uma nova ferramenta em sorologia não convencional que utiliza a citometria de fluxo para a pesquisa simultânea de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi*, anti-*L. braziliensis* e anti-*L. chagasi*. Os resultados prévios demonstraram sua excelente performance além de outras vantagens que incluem desde simplicidade de realização da técnica e uso de microvolumes de amostras biológicas até a possibilidade de automação, com alta capacidade de detecção (Martins-Filho et al., 1995; Rocha et al., 2006; Vitelli-Avelar et al., 2007; Pissinate et al., 2008; Garcia et al., 2009; Teixeira-Carvalho et al., 2014).

Em nosso estudo, o recELISA apresentou maior positividade para doença de Chagas (60,4%) em comparação com o FC-TRIPLEX-IgG1 (35,2%) ($p = 0,001$), sendo a concordância entre os métodos considerada falha ($k = 0,2$). Esta alta positividade também pode ser observada em comparação com os métodos de triagem: o recELISA apresentou mais resultados positivos entre as amostras negativas no ELISA-II do que entre as indeterminadas ($p = 0,0056$) e mesmo entre as positivas ($p = 0,0233$). Da mesma forma, o recELISA apresentou mais resultados positivos entre as amostras negativas na RIFI do que entre as positivas ($p = 0,0488$). Por outro lado, o FC-TRIPLEX-IgG1 apresentou mais resultados positivos entre as amostras positivas no ELISA-I do que entre as indeterminadas ($p = 0,0003$) e entre as indeterminadas na RIFI do que entre as negativas ($p = 0,0021$).

Considerando a soma de todos os resultados positivos em cada um dos testes de triagem realizados, 64,9% foram confirmados como positivos pelo recELISA e 53,7% pelo FC-TRIPLEX-IgG1. Segundo Ferreira e Avila (2001), a ocorrência de resultados falso-positivos – que, de acordo com o FC-TRIPLEX-IgG1, foi de 46,3% – pode ser freqüente em bancos de sangue, onde o ELISA tem a zona de indeterminação (boderline) correspondente ao dobro do considerado em laboratórios clínicos ($\pm 10\%$ do valor do cut off em laboratórios clínicos e $\pm 20\%$ em bancos de sangue). Esse aumento visa melhorar a sensibilidade do teste, protegendo ao máximo o receptor contra infecções hemotransmissíveis com baixos títulos de anticorpos. Como consequência, a especificidade do teste diminui e o índice de inaptidão sorológica tende a aumentar.

Considerando a soma de todos os resultados indeterminados em cada um dos testes de triagem realizados, o recELISA foi positivo em praticamente metade (46,6%), enquanto o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em apenas 15,5% deles. A baixa positividade do FC-TRIPLEX-IgG1 neste grupo de amostras confirma os achados de diversos estudos, segundos os quais não se consegue evidências de infecção chagásica na maioria das amostras com reações indeterminadas, o que indica falha na especificidade dos testes de triagem (Salles et al., 1996; Silveira-Lacerda et al., 2004; Ferreira-Silva, 2006; Moraes-Souza et al., 2006b; Furuchó et al., 2008; Leiby et al., 2008; Melo et al., 2009). Em estudo realizado por Soussumi (2004) no hemocentro de Ribeirão Preto/SP apenas 11,9% dos resultados indeterminados na triagem sorológica para doença de Chagas foram confirmados como positivos. Em outro estudo desenvolvido com doadores inaptos sorológicos devido à doença de Chagas, 100% das amostras inconclusivas foram negativas na hemocultura para confirmação da infecção chagásica, o que evidencia a baixa correlação entre reação inconclusiva e doença de Chagas (Ferreira-Silva et al., 2010).

Um dos problemas para obtenção de métodos sorológicos eficientes está relacionado à especificidade do diagnóstico diferencial, visto que diversas regiões do Brasil apresentam-se co-endêmicas para doença de Chagas e leishmanioses e que há reatividade cruzada entre os anticorpos dirigidos contra determinantes antigênicos comuns no *T. cruzi* e em outros parasitos, especialmente a *Leishmania*. Entretanto, ainda não existem ensaios sorológicos comercialmente disponíveis que sejam altamente específicos para confirmar se as amostras com resultado duvidoso representam reação cruzada com *Leishmania*, outra exposição parasitária ou ainda reatividade inespecífica. Por isso o FC-TRIPLEX-IgG1 pode ter grande utilidade, visto que é capaz de realizar o diagnóstico diferencial da doença de Chagas com as leishmanioses.

Dos resultados que o FC-TRIPLEX-IgG1 considerou falso-positivos para doença de Chagas nos testes de triagem, 42,1% foram positivos para leishmanioses, apontando a reação cruzada que pode ter ocorrido nos testes. Este resultado é muito próximo do apresentado na análise de desempenho realizada pelo fabricante de um dos kits utilizados neste estudo, o Gold ELISA Chagas (REM), que mostrou que o soro de pacientes com anticorpos para *Leishmania* spp. exibiram reação cruzada positiva em 43,8% das amostras testadas. Dos resultados indeterminados apontados como negativos pelo FC-TRIPLEX-IgG1, 35,0% foram positivos para leishmanioses, mostrando, mais uma vez, a possibilidade de ter ocorrido reação cruzada nos testes de triagem realizados neste estudo.

É importante considerar, ainda, a possibilidade de transmissão da leishmaniose visceral por transfusão sanguínea (de Oliveira Filho, 2013), o que já foi comprovado em cães (Owens et al., 2001; Giger et al., 2002) e em ensaios experimentais com hamsters (Paraguai-de-Souza et al., 2001). Em estudo realizado por Monteiro (2013) no Ceará, a prevalência de leishmaniose visceral assintomática em doadores de sangue foi de 16,5% e, embora atualmente não seja realizada a triagem de rotina para *Leishmania* nos hemocentros brasileiros, a autora sugere que ela seja recomendada em áreas endêmicas.

O Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico da doença de Chagas seja feito por um teste de alta sensibilidade seguido de outro com alta especificidade caso o resultado do primeiro seja positivo. Geralmente os testes utilizados com esta finalidade são ELISA e RIFI, tanto em laboratórios clínicos quanto nos hemocentros que realizam testes confirmatórios da infecção pelo *T. cruzi* (confirmação diagnóstica facultativa para hemocentros). Neste estudo, os resultados do FC-TRIPLEX-IgG1 e do recELISA foram totalmente concordantes dentre as amostras ELISA+RIFI+, com 73,9% de positivos em ambos os testes. Porém, das amostras ELISA-RIFI-, o FC-TRIPLEX-IgG1 foi negativo em 93,3%, enquanto o recELISA não

apresentou nenhum resultado negativo, o que indica, mais uma vez, a falha na especificidade deste método neste estudo. Assim, a concordância do ELISA/RIFI foi considerada boa com o FC-TRIPLEX-IgG1 ($k = 0,6$) e nula com o recELISA ($k = -0,3$).

A concordância do FC-TRIPLEX-IgG1 foi maior do que a do recELISA em relação a todos os testes de triagem analisados. O ELISA-I, realizado nos hemocentros, apresentou concordância moderada com o FC-TRIPLEX-IgG1 ($k = 0,5$) e falha com o recELISA ($k = 0,2$). A melhor concordância do FC-TRIPLEX-IgG1 foi observada em relação à RIFI ($k = 0,5$), enquanto com o recELISA ela foi considerada falha ($k = 0,2$). O mesmo ocorreu no estudo de Araújo e Berne (2013), em que o TESA-blot, teste confirmatório que tem mostrado um ótimo desempenho no diagnóstico da doença de Chagas, também apresentou melhor concordância com a RIFI e menor concordância com o recELISA, que também foi considerada falha. Dado que nas amostras POS_T a concordância do FC-TRIPLEX-IgG1 com o recELISA foi boa ($k = 0,7$), a incompatibilidade de resultados ocorreu nas amostras DISC_T ($p = 0,0001$), sendo neste grupo a concordância entre os métodos considerada pobre ($k = 0,1$).

Portanto, o desempenho dos métodos confirmatórios foi diferente entre as amostras discordantes nos testes de triagem: o recELISA foi positivo em 60,0% das amostras positivas em dois testes de triagem, em 37,5% das amostras positivas em apenas um teste de triagem e em 68,2% das amostras indeterminadas ou negativas em todos os testes de triagem, enquanto o FC-TRIPLEX-IgG1 foi positivo em 44,0%, 8,3% e 13,6%, respectivamente. Conforme pode ser observado nos resultados acima, a positividade do recELISA foi especialmente elevada nas amostras negativas ou indeterminadas nos testes de triagem. Assim, apesar de seus diferenciais técnicos, a especificidade desta técnica não parece ter sido consideravelmente maior que a do ELISA convencional, como era esperado. O mesmo foi observado no estudo de Araújo e Berne (2013), em que o recELISA apresentou a menor especificidade em comparação com as técnicas por eles avaliadas, dentre elas ELISA e RIFI.

A alta positividade do recELISA e sua diferença de desempenho em relação ao FC-TRIPLEX-IgG1 podem ser explicados em parte pela reatividade cruzada com anticorpos contra *Leishmania* sp., dado que os soros são provenientes de estados co-endêmicos para doença de Chagas e leishmanioses, além da observação de que 35,0% das amostras positivas para LT no FC-TRIPLEX-IgG1 foram positivas para doença de Chagas no recELISA. Na comparação do recELISA com os outros métodos de sorodiagnóstico da doença de Chagas, Araújo e Berne (2013) não tiveram problemas com reações cruzadas, isso porque não há relatos de leishmanioses na região onde as amostras do estudo foram coletadas. Por outro lado, a leishmaniose é endêmica em Belo Horizonte, está aumentando a incidência nos

estados de Pernambuco e de São Paulo, com o agravante deste último ser um multicentro que recebe migrantes de todo país.

Geralmente os estudos de especificidade dos kits diagnósticos utilizam como amostragem soros de indivíduos presumivelmente saudáveis, não sendo utilizados soros de indivíduos de regiões co-endêmicas para doença de Chagas e leishmaniose para determinar a reação cruzada e a taxa de falso-positivos. No entanto, a infecção por *Leishmania*, tanto aguda quanto crônica, é bem conhecida por induzir anticorpos que reagem de maneira cruzada com vários testes sorológicos disponíveis no mercado, visto que a *Leishmania* sp. possui muitas semelhanças genéticas com o *T. cruzi* e seus antígenos podem apresentar os mesmos epítomos (Schattschneider et al., 1992; Sánchez et al., 2001; Umezawa et al., 2001; Gualberto et al., 2005; Flores-Chávez, et al., 2010; MS et al., 2010a).

No entanto, a maior positividade no recELISA, de 62,9%, foi observada entre as amostras negativas para as três doenças no FC-TRIPLEX-IgG1 e, portanto, a reatividade cruzada não parece ter sido o maior problema do recELISA neste estudo. De fato, um dos antígenos recombinantes utilizados no teste, o SAPA, parece ser sensível e específico o suficiente para ser usado inclusive em regiões co-endêmicas para distinguir entre infecção crônica por *T. cruzi* e por *Leishmania* (Gil et al., 2011). No entanto, os estudos mostram um bom desempenho dos antígenos separadamente e o problema pode ter sido na mistura de antígenos utilizados no recELISA.

Esta alta positividade do recELISA em relação ao FC-TRIPLEX-IgG1 provavelmente não ocorreu porque o FC-TRIPLEX-IgG1 foi pouco sensível no estudo, visto que, a análise dos outros métodos realizados mostrou que o recELISA também está apresentando mais resultados positivos em amostras negativas do que entre amostras positivas tanto no ELISA-II ($p = 0,0233$) quanto na RIFI ($p = 0,0488$). Neste estudo, considerando o total de amostras, 33,0% foram negativas no FC-TRIPLEX-IgG1 e positivas no recELISA, enquanto no estudo de Araújo e Berne (2013) 31,1% foram negativas no TESA-blot e positivas no recELISA e os autores consideraram estes resultados como falso-positivos. Assim, no estudo citado, o recELISA apresentou o maior número de resultados falso-positivos quando comparado ao teste confirmatório TESA-blot.

Além das reações cruzadas, a variação na performance dos testes sorológicos realizados neste estudo, gerando resultados inconclusivos/discordantes ou falso-positivos, pode ser explicada pela grande variedade de antígenos de *T. cruzi* empregados na preparação do extrato usado para capturar os anticorpos específicos do soro teste nos diferentes kits

diagnósticos. Possíveis falhas na preparação destes antígenos para a sensibilização de placas também podem levar a problemas no desempenho destes testes (Frade et al., 2011).

Na América Latina circulam diferentes cepas de *T. cruzi* e cada linhagem ou população predominante em determinado local é conhecida como cepa regional. A heterogeneidade e a variabilidade genética entre essas cepas são bem conhecidas e cada uma delas modifica as condições biológicas, a virulência e os perfis clínicos e imunológicos do hospedeiro de maneira diferente. Por isso, para melhorar o desempenho das técnicas, seria vantajoso que pelo menos o extrato antigênico utilizado nos testes fossem compostos por cepas de diferentes regiões, o que não ocorre na maioria dos kits diagnósticos disponíveis no mercado (Añez et al., 2001; Berrizbietia et al., 2004; Gutierrez et al., 2004; Sánchez et al., 2004; Zarate-Blades et al., 2007; Furuchó et al., 2008).

Do mesmo modo, a forma parasitária utilizada como fonte antigênica pode interferir na performance dos testes sorológicos, visto que cada uma delas apresenta diferentes frações antigênicas imunodominantes (Umezawa et al., 2001; Berrizbietia et al., 2004). A maioria dos testes comerciais disponíveis – inclusive os kits de ELISA e RIFI utilizados neste estudo – emprega extratos brutos totais, frações subcelulares ou antígenos solúveis purificados preparados a partir de formas epimastigotas de cepas cultivadas em laboratório, embora não seja esta a forma parasitária presente na infecção humana. Além disso, esta mistura de proteínas complexas de composição desconhecida faz com que haja sérias dificuldades para padronização das técnicas, levando a resultados falso-positivos (Belluzo et al., 2011; Marcipar e Lagier, 2012).

O FC-TRIPLEX-IgG1, apesar de também utilizar apenas a forma epimastigota fixada de *T. cruzi*, faz uso simultâneo das formas promastigotas de *L. chagasi* e de *L. braziliensis* em plataforma única, o que promove a competição entre os antígenos destes parasitos pelos anticorpos do soro teste e faz com que a reatividade cruzada seja inibida, já que cada anticorpo terá mais afinidade com seu antígeno específico.

O recELISA, por sua vez, utiliza uma mistura de 6 antígenos recombinantes, a maioria deles provenientes de epimastigotas, embora exista também uma proteína de superfície de tripomastigotas (antígeno 2). O fato dos antígenos serem recombinantes elimina a questão da reatividade com epitopos de carboidratos, que poderia justificar a alta positividade do método neste estudo. Isto porque as bactérias, utilizadas no processo de engenharia genética para produção dos antígenos, não possuem a maquinaria necessária para adicionar carboidratos às proteínas e, portanto, os antígenos recombinantes não são glicosilados (Marcipar e Lagier, 2012). Segundo Levy et al., (2009) e Sabino et al. (2010), a *Escherichia coli*, presente na

microbiota intestinal humana e causadora de algumas doenças, também pode ser causa de problemas em imunoenaios baseados em proteínas recombinantes, visto que a maioria dessas proteínas é produzida utilizando células desta bactéria.

Além das questões relacionadas aos kits, os próprios fabricantes apontam outras interferências que podem ser responsáveis por reações inespecíficas em testes sorológicos, que são a causa mais provável da alta positividade do recELISA neste estudo. Entre elas pode-se citar contaminação das soluções e materiais utilizados durante o teste, contaminação cruzada entre amostras, amostras inadequadas – após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, armazenadas em temperaturas inadequadas, hemolisadas, hiperlipêmicas, com contaminação microbiana – amostras positivas para fator reumatoide ou contendo auto-anticorpos, além daquelas provenientes de indivíduos com infecções auto-limitadas com declínio de anticorpos, doença de Chagas ativa com baixo nível de anticorpos (baixa reatividade), em tratamento, com outras parasitoses.

7.2 Estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem

A taxa de descarte de bolsas de sangue no Brasil é de aproximadamente 10 a 20%, porcentagem que excede a de países desenvolvidos e é consequência, principalmente, de resultados não negativos nos testes de triagem para doenças infecciosas (Salles et al., 2003). Em estudo realizado no estado do Paraná, 2,10% das bolsas de sangue foram descartadas devido à positividade para anticorpos anti-*T. cruzi* na triagem sorológica e apenas 33,3% destas tiveram os resultados confirmados (Borelli et al., 2013).

A doença de Chagas está entre as principais causas de inaptidão definitiva para doação de sangue e os candidatos com antecedentes de diagnóstico clínico ou sorológico, ainda que tratados ou assintomáticos, são excluídos de forma permanente, da mesma forma como os candidatos com história de contato domiciliar com triatomíneos (MS, 2004a).

Embora a alta sensibilidade dos métodos sorológicos de triagem utilizados em bancos de sangue diminua a possibilidade de ocorrer transmissão transfusional da doença de Chagas, ela também é responsável pela ocorrência de muitos resultados falso-positivos. Estes resultados fazem com que muitas bolsas de sangue sejam erroneamente descartadas, comprometendo o suprimento do hemocentro, e que potenciais doadores sejam impedidos de forma definitiva de doar sangue. Por isso, a retestagem das amostras não negativas, utilizando métodos confirmatórios altamente específicos e eficazes, poderia possibilitar a reinclusão de indivíduos com resultado negativo como doadores.

Em nosso estudo, amostras de indivíduos com antecedente de não negatividade na triagem sorológica para doença de Chagas realizada há 10 anos no hemocentro foram retestadas com os métodos de triagem (ELISA e RIFI) e muitas delas apresentaram resultado negativo em ambos os testes, mostrando que provavelmente houve uma quantidade significativa de falso-positivos na triagem inicial, como era esperado. As amostras foram agrupadas conforme os resultados em ELISA-RIFI- (n = 50) e ELISA+RIFI+ (n = 50) e, em seguida, foram realizados os métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1.

Considerando os quatro testes realizados, a soropositividade persistente foi verificada em 47,0% das amostras, enquanto 49,0% foram negativas em todos os métodos. Das amostras ELISA+RIFI+, o recELISA confirmou todos os resultados como positivos e o FC-TRIPLEX-IgG1 confirmou 94,0%. Das amostras ELISA-RIFI-, o recELISA também confirmou todos os resultados como negativos e o FC-TRIPLEX-IgG1 confirmou 98,0%. Não houve reatividade cruzada com a amostra positiva para LT no FC-TRIPLEX-IgG1, visto que ela apresentou resultado negativo para doença de Chagas em todos os outros métodos realizados.

No estudo anterior, os métodos confirmatórios apresentaram um bom desempenho no grupo POS_T, cujos resultados eram concordantes nos testes de triagem. O mesmo foi observado neste estudo, em que as amostras tinham os mesmos resultados nos testes ELISA e RIFI e a concordância do recELISA e do FC-TRIPLEX-IgG1 foi de 100,0% e 96,0%, respectivamente.

Assim, a diferença de desempenho observada entre os métodos confirmatórios estudados parece ocorrer apenas quando as amostras apresentam resultados discordantes nos testes de triagem, seja devido à diferença de sensibilidade e especificidade, à variedade de cepas e formas parasitárias utilizadas nos kits diagnósticos, à reatividade cruzada ou a outras reações inespecíficas que fazem com que alguns testes utilizados para o sorodiagnóstico da doença de Chagas reajam e outros não. Portanto, tanto o recELISA quanto o FC-TRIPLEX-IgG1 parecem ser aplicáveis para a monitoração de indivíduos com história progressiva positiva na triagem sorológica para doença de Chagas em bancos de sangue.

Os resultados dos estudos sobre “esclarecimento diagnóstico” e sobre “monitoração sorológica pós-triagem” sugerem que o FC-TRIPLEX-IgG1 é uma ferramenta promissora, de alta especificidade e desempenho, que pode ser aplicada em hemocentros para auxiliar no esclarecimento diagnóstico de resultados indeterminados/discordantes na triagem sorológica para doença de Chagas e na monitoração sorológica periódica de indivíduos com precedente de não negatividade, visando sua exclusão ou reinclusão como possível doador.

Considerando que as reações indeterminadas apresentam risco social ao doador; que apesar de terem sofrido aumento nos últimos anos, a prevalência destas reações é relativamente baixa; e que o custo do descarte de bolsas erroneamente rotuladas como positivas é significativo, o uso de um teste de alta especificidade e que possa inclusive detectar possíveis reações cruzadas, como o FC-TRIPLEX-IgG1, em amostras não negativas para doença de Chagas seria vantajoso para os hemocentros, com um bom custo-benefício.

8 CONCLUSÕES

- Os testes de triagem ELISA-I, ELISA-II e RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* apresentaram uma alta taxa de discordância entre os resultados.
- O ELISA-I (51,6%) e o ELISA-II (68,1%) apresentaram positividade superior à RIFI (27,5%), indicando serem métodos mais sensíveis.
- Os testes de triagem ELISA-I, ELISA-II e RIFI apresentaram um grande número de reações indeterminadas, confirmando o que vem sendo observado em hemocentros do Brasil.
- De acordo com os métodos confirmatórios recELISA e FC-TRIPLEX-IgG1, todos os testes de triagem apresentaram falhas de desempenho, com resultados falso-positivos e, em menor proporção, falso-negativos.
- O FC-TRIPLEX-IgG1 foi capaz de realizar o diagnóstico diferencial entre doença de Chagas e leishmanioses, o que possibilita sua utilização no esclarecimento de resultados falso-positivos nos testes de triagem que correspondem a casos de reatividade cruzada com *Leishmania* sp.
- A considerável taxa de positividade do FC-TRIPLEX-IgG1 entre as amostras positivas no ELISA-I e indeterminadas na RIFI sugere sua real aplicabilidade na confirmação de resultados e no esclarecimento diagnóstico de amostras não negativas.
- O recELISA apresentou resultado inconsistente, com elevada taxa de positividade principalmente entre amostras negativas nos testes ELISA-II, RIFI e FC-TRIPLEX-IgG1, sugerindo uma baixa especificidade do método.
- A concordância do FC-TRIPLEX-IgG1 foi maior que a do recELISA em relação a todos os testes de triagem analisados, principalmente devido à diferença de desempenho observada no grupo de amostras discordantes.

- No grupo de amostras não negativas que foram persistentemente positivas nos testes de triagem (POS_T), o recELISA e o FC-TRIPLEX-IgG1 apresentaram um desempenho semelhante para confirmação diagnóstica, sendo boa a concordância entre os métodos neste grupo.
- Os resultados do estudo sobre monitoração sorológica pós-triagem reforçam a conclusão anterior, visto que o recELISA confirmou como positivos todos os resultados ELISA+RIFI+ e o FC-TRIPLEX-IgG1 confirmou 94,0%.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo permitiram valiosas conclusões acerca da aplicabilidade do FC-TRIPLEX-IgG1 em hemocentros para esclarecimento diagnóstico e monitoração sorológica de doadores com resultado não negativo na triagem sorológica para doença de Chagas. No entanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de se caracterizar melhor esta nova metodologia antes de sua introdução na rotina laboratorial.

Como não existe um método laboratorial considerado padrão-ouro para confirmar com segurança os resultados do FC-TRIPLEX-IgG1 e demais técnicas realizadas, pretende-se utilizar modelos preditivos (Machado-de-Assis et al., 2012) para compará-los aos dados epidemiológicos dos doadores participantes deste estudo obtidos na entrevista realizada durante a triagem clínica no serviço de hemoterapia. Dados como local de origem, faixa etária e contato prévio com o inseto transmissor são fundamentais para identificar indivíduos com maior risco de estarem infectados pelo *T. cruzi* e podem auxiliar no diagnóstico correto. Sabe-se, por exemplo que, devido ao controle da doença de Chagas em muitos estados brasileiros, indivíduos de faixa etária mais elevada (acima de 30 anos) tem maior chance de estarem infectados. Com estes dados pode-se verificar também se o desempenho do FC-TRIPLEX-IgG1 varia de acordo com cada região de estudo, visto que ele é dependente da prevalência da doença.

Aliado aos achados epidemiológicos, pretende-se comparar os resultados do FC-TRIPLEX-IgG1 com outros testes confirmatórios para doença de Chagas que têm sido descritos para esclarecer resultados duvidosos nos testes sorológicos convencionais. Dentre eles, o TESA-blot (Umezawa et al., 1996; Caballero et al., 2007) é o que mais tem se aproximado do perfil de desempenho característico de um teste de referência padrão-ouro, que deve apresentar taxa de falso-positivos e de falso-negativos de aproximadamente 0%. Este teste utiliza frações das formas infectantes do *T. cruzi* (trypomastigote excreted-secreted antigens - TESA) no formato de Imunoblotting (Frade et al., 2011). Outros testes confirmatórios que também podem ser comparados ao FC-TRIPLEX-IgG1 incluem INNO-LIA Chagas (Saez-Alquézar et al., 2000), RIPA (Otani et al., 2009) e imunoensaio Abbott Chagas (Shah et al., 2010).

Pretende-se também realizar testes sorológicos específicos para detectar anticorpos anti-*Leishmania* sp. nas amostras positivas para leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar no FC-TRIPLEX-IgG1, comparando os resultados encontrados.

Em uma outra abordagem, pretende-se verificar o comportamento das amostras estudadas em relação ao algoritmo de classificação proposto por Sabino et al. (2010) para amostras inconclusivas com base na reatividade para o recELISA. Neste algoritmo, as amostras foram classificadas como confirmadas positivas (CP), provavelmente positivas (PP), provavelmente outras infecções parasitárias (POPI) e falso-positivas (FP).

Outros estudos envolvendo a metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 também estão sendo conduzidos, dentre eles um estudo populacional para avaliar a aplicabilidade da metodologia em área endêmica para leishmaniose tegumentar em que também há casos de doença de Chagas e de leishmaniose visceral (estudo populacional) e um estudo para avaliar o desempenho do FC-TRIPLEX-IgG1 em amostras de soro provenientes de outros países da América Latina. Além disso, uma inovação tecnológica da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 também está sendo realizada, utilizando em plataforma única não só antígenos brutos mas também um conjunto de antígenos purificados/recombinantes, visando aumentar a especificidade sem prejudicar a sensibilidade da técnica.

Por fim, em uma etapa subsequente, pretende-se realizar a validação da metodologia FC-TRIPLEX-IgG1 utilizando a análise de classes latentes, que estima a sensibilidade e a especificidade para cada método diagnóstico estudado, visto que não há um método padrão-ouro para comparação dos resultados (Machado-de-Assis et al., 2012). A validação será realizada segundo os critérios pré-estabelecidos pelos órgãos reguladores em uma população constituída por controles positivos e negativos bem caracterizados, provenientes de um amplo painel de soros de bancos de sangue. Após a completa validação, a metodologia estará apta para o uso em larga escala na rotina laboratorial e poderá ser difundida e aplicada não só em hemocentros, mas também em laboratórios clínicos e de pesquisa. É importante considerar que, atualmente no Brasil, a grande maioria das instituições de pesquisa e laboratórios de referência em saúde pública possui a infraestrutura necessária à execução do FC-TRIPLEX-IgG1.

10 ANEXO**10.1 Anexo A** – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (N.157/2007).

Belo Horizonte, 10 de abril de 2007

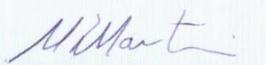
OFÍCIO Nº 20 / 2007
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezada Senhora Pesquisadora, Mariléia Chaves Andrade

Encaminhamos o parecer consubstanciado referente ao seu projeto de pesquisa “Aplicabilidade de uma metodologia diagnóstica – FC-AFEA – no esclarecimento das situações de sorologia não negativa para a doença de Chagas em Hemocentros”, nº de registro 157. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,


Marina Lobato Martins

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre S, Silver AM, Brito MEF, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS. Design, construction and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J. Clin. Microbiol.* 2006;(44):1043-6.

Almeida Neto C, Mendrone Júnior A, Salles NA, Chamone DA, Sabino EC. The role of the doctor in the reduction of residual risk of the virus transmission of human immunodeficiency (HIV) for blood transfusion and blood constituent. *Diagn Tratamento.* 2009;14(2):57-61.

Andrade SG. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Orgs). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.177-200.

Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, Stolf AM, Ramírez JL, Teixeira MM. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health.* 2004;(9):1319-26.

Araújo AB, Vianna EE, Berne ME. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody detection in blood donors in the Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(6):480-2.

Araújo AB, Berne ME. Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2013 Apr;17(2):174-8.

Belluzo MS, Ribone ME, Camussone C, Marcipar IS, Lagier CM. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. *Anal. Biochem.* 2011;408(1),86-94.

Bern C, Coura JC, Goldenberg S, Guhl F, Junqueira ACV, Lorca M, et al. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. Médecins Sans Frontières. Campaign for Access to Essential Medicines. Technical Report. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;(41):315-9.

Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, del Carmen Abastoflor M, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz Bolivia. *Clin Infect Dis*. 2009;(49):1167-74.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011;(24):655-81.

Berrizbietia M, Ndao M, Gottschalk M, Aché A, Vásquez F, Lacouture S, Medina M, Ward BJ. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *J Clin Microbiol*. 2004;(42):1766-9.

Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy: where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;(52):300-16. [PubMed; 20109600].

Blejer JL, Saguier MC, Dinapoli RA, Salamone HJ. Prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors. *Medicina (B Aires)*. 1999;(59):129-32.

Borelli SD, Mazzola JC, Matta ACG, Takemoto AY, Bértoli M. Blood discard rate and the prevalence of infectious and contagious diseases in blood donors from provincial towns of the state of Paraná, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(6):395-9.

Bracho CG, Garcia LG, Verdugo JF, et al. Riesgo de trasmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;(4):94-9.

Brum L. A não erradicação da doença de Chagas no Brasil. Médicos sem fronteiras. BBC Brasil. 2012 Jun. [citado em 9 jun 2014]. Disponível em: <http://jornalggn.com.br/blog/luisnassif/a-nao-erradicacao-da-doenca-de-chagas-no-brasil>.

Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saes-Alquezar A, Umezawa E. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol*. 2007;(14):1045-9.

Callegari-Jaques SM. Bioestatística. Princípios e aplicações. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Cantley PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, Todd CW, Currier M, Hand S, Varnado W, Dotson E, Hall C, Jett PL, Montgomery SP. The United States *Trypanosoma cruzi* infection study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas' disease among United States blood donors. *Transfusion*. 2012;(52):1922-30.

Carneiro-Proietti AB, Sabino EC, Sampaio D, Proietti FA, Goncalvez TT, Oliveira CD, Ferreira JE, Liu J, Custer B, Schreiber GB, Murphy EL, Busch MP. Demographic profile of blood donors at three major Brazilian blood centers: results from the International REDS-II study, 2007 to 2008. *Transfusion*. 2010;(50):918-25.

Carrasco RL, Brenieri SF, Poch O, Miguez HV, Selaes H, Antezana G, Desjeux P, Carlier Y. Chagas serology and its problems. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1985;(1):79-84.

Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquézar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF, Goldenber S. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*. 1993;(33):830-4.

Castro AM. Avaliação de métodos laboratoriais para o estabelecimento de critério de cura da doença de Chagas humana [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002. 134p.

CDC. Centro para Controle e Prevenção de Doenças (US), DPDx. American Trypanosomiasis. Fact Sheet. 2013. [citado em 25 jun 2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>.

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

Clemente WT, Rabello A, Faria LC, Peruhype-Magalhães V, Gomes LI, da Silva TAM, Nunes RVP, Iodith JB, Protil KZ, Fernandes HR, Cortes JRG, Lima SSS, Lima AS, Romanelli RMC. High Prevalence of Asymptomatic *Leishmania* spp. Infection Among Liver Transplant Recipients and Donors From an Endemic Area of Brazil. *Am. J. Transplant.* 2014;14: 96-101.

Cogo JP, Foletto A, Monteiro JB, Pereira KN, Ribeiro MCP, Segala Z, Siqueira F, Beck ST. Perfil epidemiológico de doadores de sangue soropositivos para doença de Chagas na Região Sul Saúde (Santa Maria), Santa Maria. 2014;40(1):125-32.

Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Rocha MOC, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(1):112-8.

Coura JR. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bol Chil Parasitol.* 1996;(51):69-75.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas' disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;(106):641-645.

CPqRR. Centro de Pesquisas René Rachou. FIOCRUZ. [citado em 22 abr 2014]. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/>

Custer B, Agapova M, Bruhn R, Cusick R, Kamel H, Tomasulo P, Biswas H, Tobler L, Lee TH, Caglioti S, Busch M. Epidemiologic and laboratory findings from 3 years of testing United States blood donors for *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion.* 2012;(52):1901-11. [PubMed; 22339233].

Da Silva MMF. Análise do desempenho de testes imunodiagnósticos para doença de Chagas e sua correlação com dados epidemiológicos para definição do perfil sorológico de doadores de sangue [tese]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011. 116p.

De Almeida BR, Santiliano FC. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer.* 2012;8(14).

De Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PRZ, Gomes JAS, Sathler-Avelar R, Rocha MOC, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2011 May;5(5):e992. [PMCID; PMC3104959].

De Carvalho AT, Ribeiro GA, Nogueira RF. Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias. Instituto Oswaldo Cruz. 2010;1-111.

De Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 12 ed. São Paulo: Atheneu; 2011. p.89-114.

De Lima LM, Alves NP, Barbosa VF, Pimenta GA, Moraes-Souza H, Martins PRJ. Prevalence of Chagas disease in blood donors at the Uberaba Regional blood center, Brazil, from 1995 to 2009. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(6):723-6.

De Marchi CR, Amato Neto E, Almeida IC. Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;(40):68-70.

De Oliveira Filho JN. Anticorpos Anti-*Trypanosoma cruzi* como preditivos de infecção por *Leishmania infantum* [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2013. [citado em 5 mar 2014]. Disponível em: http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/1/7786/1/JetheNOF_DISSERT.pdf

Dias JCP, Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(4):373-83.

Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Orgs). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.48-71.

Dias JCP. Elimination of Chagas' disease transmission: perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;(104):41-5.

Dias JCP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011 [citado em 1 jul 2014];44(2):68-72. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000800011&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000800011>.

Diotaiuti L, Pereira MH, Barbosa SE, Guarneri AA, Belisário CJ. Hemiptera. In: Neves DP. Parasitologia Humana. 12 ed. São Paulo: Atheneu; 2011. p.357-372.

Ferreira AW, Avila SLM. Doença da Chagas. In: Ferreira AW, Avila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.241-249.

Ferreira CS, Amato-Neto V, Gakiya E, Bezerra RC, Rodriguez-Alarcon RS. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas' disease. Rev Inst Med Trop. 2003;(45):41-2.

Ferreira-Silva MM. Sensibilidade e especificidade de testes sorológicos para doença de Chagas usados na triagem sorológica de doadores de sangue [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2006.

Ferreira-Silva MM, Pereira GA, Lages-Silva E, Moraes-Souza H. Socioepidemiological screening of serologically ineligible blood donors due to Chagas' disease for the definition of inconclusive cases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(6):800-5.

Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para El diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(5):284-293.

Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. Acta Tropica. 2011;(117):10-3.

Freitas JLP, Amato Neto V, Sonntag R, Biancalama A, Nussenzweig V, Barreto JG. Primeiras ratificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev Paul Med.* 1952;(40):36-40.

Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes EV, Sanches MC, Guastini CM, Teixeira AR, Shikanai-Yasuda MA. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Health.* 2008;13(12):1527-33.

Gadelha AAM, Verçosa AFA, Lorena VMB, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WV, Ferreira AGP, Silva ED, Krieger MA, Goldenberg, S.; Gomes, Y. M. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test. *Vox Sanguinis.* 2003;(85):165-170.

Garcia L.M, Coelho-dos-Reis JGA, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Rocha RDR, Araújo MSS Gomes IT, Carvalho SF, Dietze R, Lemos EM, Andrade MC, Martins-Filho OA. Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC- AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in american visceral leishmaniasis. *J Immunological Methods.* 2009;(350):36-45.

Gascon JA, Bern CB, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica.* 2009;115(1-2):22-7.

Giger U, Oakley DA, Owens SD, Schantz P. *Leishmania donovani* transmission by packed RBC transfusion to anemic dogs in the United States. *Transfusion.* 2002 Mar;42(3):381-3.

Gil J, Cimino R, Lopez Q, Cajal SI, Acosta N, Juarez M, Zacca R, Orellana V, Krolewiecki A, Diosque P, Nasser J. Reactivity of GST-SAPA antigen of *Trypanosoma cruzi* against sera from patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Medicina (B Aires).* 2011;71(2):113-119.

Gomes LMX, Santos AC, Lima FR, Barbosa TLA, Teles JT. O impacto da doença de Chagas no cotidiano do portador. Fundação Técnica e Científica do Desporto Vila Real, Portugal. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica. Motricidade. 2012;8(2):204-11. [citado em 6 jun 2014]. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=273023568024>.

Gómez LA, Peñuela O, Higuera F. Prevalence of antibodies against transfusion-transmissible infections (TTI) in blood donors from the Colombian eastern regionby. Clin.Lab. 2014;60(5):869-71.

Gonçalez TT, Sabino EC, Schlumpf KS, Wright DJ, Mendrone A, Lopes MS, Leão S, Miranda C, Capuani L, Carneiro-Proietti AB, Basques F, Ferreira JE, Busch M, Custer B; NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Analysis of donor deferral at three blood centers in Brazil. Transfusion. 2013;(53):531-8.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004 Sep [2 abr 2014];7(3):338-49. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>.

Gualberto RCR, Bentes IRG, Valente CID, Francês LTVM, Lemos JAR, Brito Junior LC. Reação sorológica cruzada para doença de Chagas e anti-HCV em pacientes com leishmaniose (sic). Rev Bras Hematol Hemoter. 2005;(27):335.

Guhl F, Lazdins-Helds JK, eds. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 17 a 20 de abril de 2005, Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires: Organización Mundial de la Salud/Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR); 2007. [citado em 2 fev 2014]. Disponível em: http://www.who.int/tdroid/publications/publications/swg_chagas.htm.

Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas' disease in a Colombian endemic area. Parasitology. 2004;(129):439-44.

HEMOMINAS. Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. [citado em 22 abr 2014]. Disponível em: <http://www.hemominas.mg.gov.br/hemominas/index.html>

HEMOPE. Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco. [citado em 22 abr 2014]. Disponível em: <http://www.hemope.pe.gov.br/index.php>

Herwaldt BL. Laboratory acquired parasitic infection from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;(14):659-88.

Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJO, Araújo SM, Vier BP, Gomes ML. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow up by the polymerase chain reaction: case report. *Rev Inst Med Trop.* 2009;(51):295-8.

Kirchhoff LV, Paredes P, Lomelí-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejía M, Peña-Muñoz JG. Transfusion-associated Chagas' disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion.* 2006;(46):298-304.

Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol.* 1982;(128):2009-12.

Krettli AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(I):142-51.

Kun H, Moore A, Mascola L, Stevrer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M; Chagas' disease in transplant recipients investigation team. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2009;(48):1534-40.

Leiby DA, Fucci MH, Stumpf RJ. *Trypanosoma cruzi* in a low-to moderaterisk blood donor population. *Transfusion.* 1999;(39):310-5.

Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. J Clin Microbiol. 2000;(38):639-42.

Leiby DA, Herron RM JR, Garratty G, Herwaldt BL. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in US Blood donors with serologic evidence of infection. J Infect Dis. 2008;(198):609-13.

Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SFG, Rocha RDR, Pissinate JF, Martins-Filho OA, Dietze R. Detection of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of american visceral leishmaniasis Clin Vaccine Immunol. 2007 May;14(5):569-76.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G. Chagas' disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis. 2010;(10):556-70. [PubMed; 20670903].

Levy MZ, Bowman NM, Kawai V, Plotkin JB, Waller LA, Cabrera L, Steurer F, Seitz AE, Pinedo-Cancino VV, Cornejo del Carpio JG, Cordova Benzaquen E, McKenzie FE, Maguire JH, Gilman RH, Bern C. Spatial patterns in discordant diagnostic test results for Chagas' disease: links to transmission hotspots. Clin Infect Dis. 2009;(48):1104-6.

LIAC Central Sorológica. Doença de Chagas. Central de triagem laboratorial de doadores. [citado em 1 fev 2014]. Disponível em: http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias_chagas.html

Lorca M, Child R., Garcia A, Silva M, Martinez L, Jerez G, Toledo I, Mazzano D. Evaluation of commercial kits used for Chagas' disease diagnosis in blood banks in Chile. II. Routine Application. Rev Med Chil. 1994;(122):925-31.

Loureiro P, de Almeida-Neto C, Proietti AB, Capuani L, Gonzalez TT, de Oliveira CDL, Leão SC, Lopes MI, Sampaio D, Patavino GM, Ferreira JE, Bлаты PF, Lopes MED, Mendrone-Junior A, Salles NA, King M, Murphy E, Busch M, Custer B, Sabino EC. Contribution of the Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) to research on blood transfusion safety in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36(2):152-8.

Luquetti A, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Zigman B, Andrade Z, Barral-Neto M. (eds), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.48-74.

Machado-de-Assis GF, Silva AR, do Bem VAL, Bahia MT, Martins-Filho OA, Dias JCP, Albajar-Viñas P, Torres RM, de Lana M. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Aug;19(8):1283-91.

Madeya ML, Pfab-Tokarsky JM. Flow cytometry: an overview. *Oncol Nurs Forum.* 1992 Apr;19(3):459-63.

Malan AK, Avelar E, Litwin SE, Hill HR, Litwin CM. Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* evaluation of three enzyme immunoassay and an indirect immunofluorescent assay. *J Med Microbiol.* 2006;(55):171-8.

Marcipar IS, Lagier CM. Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins. *Current Topics in Tropical Medicine.* Rodriguez-Morales A (Ed.), 2012[citado em 5 jul 2014];273-298. ISBN: 978-953-51-0274-8, InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropicalmedicine/advances-in-serological-diagnosis-of-chagas-disease-by-using-recombinant-proteins>

Marcon GEB, Albuquerque DM, Batista AM, Andrade PD, Almeida EA, Guariento ME, Teixeira MA, Costa SC. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;(106):85-91.

Martínez-Tovar JG, Rebollar-Téllez EA, Fernández-Salas I. Seroprevalence of *T. cruzi* infection in blood donors and Chagas cardiomyopathy in patients from the coal mining region of Coahuila, Mexico. *Rev Inst Med Trop.* 2014;56(2):169-74.

Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diagn Immuno.* 1995;(2):569-73.

Martins-Filho OA, Santos SMEC, Teixeira A, Correa-Oliveira R, Rassi A, Luquetti AO, Rassi GG, Brener Z. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):1107-13.

Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect.* 2008;136(9):1153-64.

Matos CS, Coelho-Dos-Reis JG, Rassi A, Luquetti AO, Dias JC, Eloi-Santos SM, Gomes IT, Vitelli-Avelar DM, Wendling AP, Rocha RD, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, Andrade MC, Martins-Filho OA. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemotherapeutic treatment of Chagas' disease. *J Immunol Methods.* 2011 Jun;369(1-2):22-32.

Mazza S, Montana A, Benetez C, Janzi EZ. Transmisión del *Schizothrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Mepra.* 1936;(28):41-6.

Meira WS, Galvão LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chiari E. *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein: a novel antigen for use in enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3735-40.

Melo AS, Lorena VMB, Moraes AB, Pinto MB, Gomes YM. The prevalence of chagasic infection among blood donors in the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;(31):69-73.

- Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978;8(4):283-98.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas' disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;(104):17-30.
- Monteiro DCS. Prevalência de leishmaniose visceral assintomática em doadores de sangue, em área endêmica para leishmaniose no Ceará [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina; 2013. 106 p.
- Moraes-Souza H, Bordin JO. Strategies for prevention of transfusion associated Chagas' disease. *Transfus Med Rev.* 1996;(10):161-70.
- Moraes-Souza, H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(1):419-23.
- Moraes-Souza H, Martins PR, Pereira GA, Ferreira-Silva MM, Abud MB. Serological profile concerning Chagas' disease of blood donors at Uberaba Blood Center. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006a;28(2):110-4.
- Moraes-Souza H, Martins PRJ, Pereira GA, Ferreira-Silva MM, Abud MB. Significado dos testes sorológicos positivos e indeterminados para doença de Chagas na triagem dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006b;(28):105-9.
- Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. O controle da transmissão transfusional. 2011;44(II):64-7.
- Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DG, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;(95):104-7.
- Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. *Nature Reviews Microbiology.* 2003;1(1):14-5. [PMID; 15040175].

MSF. Médicos sem fronteiras. México: MSF e a Secretaria de Saúde de Oaxaca assinam acordo para melhorar o acesso a teste e tratamento de Chagas. 2014. [citado em 14 mai 2014]. Disponível em: <https://www.msf.org.br/noticias/mexico-msf-e-secretaria-de-saude-de-oaxaca-assinam-acordo-para-melhorar-o-acesso-teste-e>

MS. Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 07/80/MS 1980. Diretrizes básicas do programa nacional de sangue e hemoderivados PRÓ-SANGUE. Brasília: Ministério da Saúde; 1980.

MS. Ministério da Saúde (BR), Fundação Nacional de Saúde. Doença de Chagas. 1999 nov. [citado em 20 mai 2014]. Disponível em: <http://www.fns.gov.br/cenepi/GVE7GVE0507A.htm>.

MS. Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de Produção da Hemorrede em 2002: perfil sorológico dos doadores. 2002. [citado em 20 mai 2014]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.

MS. Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue. Brasília: Ministério da Saúde; 2004a.

MS. Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Publicada no Diário Oficial da união de 24 de junho de 2004. Brasília: Ministério da Saúde; 2004b. [citado em 18 mai 2014]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao_153_2004.pdf/.

MS. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(III).

MS. Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010a. Determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. [citado em 18 mai 2014].

Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0057_16_12_2010.html

MS. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de Bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010b.

MS. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010c.

MS. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. Sangue e hemoderivados: produção hemoterápica. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. [citado em 20 mai 2014]. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_informacao_sangue_hemoderivados_2011.pdf

Muñoz J, Portús M, Cortachan M, Fumadó V, Gascon J. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;(101):1161-2.

Oliveira BG, Abreu MNS, Abreu CDG, Rocha MOC, Ribeiro AL. Qualidade de vida relacionada à saúde na doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop,* 2011;44(2),150-6.

Oliveira LR, Assis LLT, Matos AL, Calil MCFR, Moraes-Souza H. Reativação de doença de Chagas com envolvimento de Sistema Nervoso Central durante tratamento de linfoma não-Hodgkin. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;(32):269-72.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Control of Chagas' disease. WHO Tech. Rep. Ser. 905. Geneva: WHO; 2002.

OMS. Organização Mundial de Saúde. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2010a. p.1-172.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Diagnostics and Laboratory Technology. Anti-*Trypanosoma cruzi* assays: operational characteristics. Report 1. Geneva: WHO; 2010b. p. 1-38.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Neglected tropical diseases. The 17 neglected tropical diseases. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet n°340; 2014 [citado em 8 mar 2014]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Chagas' disease and the nervous system. Scientific Publication n° 547. 1994;1:29.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas; 2006. [citado em 18 fev 2014]. 28p. Disponível em: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf>.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Key facts on Neglected Infectious Diseases. Chagas. 2014. [citado em 11 fev 2014] Disponível em: http://www.paho.org/Hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24717&Itemid=

Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, Sabino EC. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas' disease. *Transfusion*. 2009;(49):1076-82.

Owens SD, Oakley DA, Marrayott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Oct;219(8):1076-83.

Ownby HE, Korelitz JJ, Busch MP, Williams AE, Kleinman SH, Gilcher RO, Nourjah P. Loss of volunteer blood donors because of unconfirmed enzyme immunoassay screening results. *Retrovirus Epidemiology Donor Study. Transfusion.* 1997;37(2):199-205.

Paraguai-de-Souza E, Esteves Pereira AP, Machado FC, Melo MF, Souto-Padron T, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamster. *Acta Trop.* 2001 Sep;1;80(1):69-75.

Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas' disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2013;(19):34.

Pereira VRA, Reis LC, Souza MA, Oliveira AP, Brito MEF, Lage OS, Andrade MC, Rocha RDR, Martins-Filho OA. Evaluation of anti-lived and anti-fixed-*Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Micr Infec Dis.* 2012;74:292-298.

Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. J.A. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(6):1139-47.

Picka MC, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas' disease. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(2):226-33.

Pirard M, Iihoshi N, Boelaert M, Basanta P, López F, Stuyft PV. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. *Transfusion.* 2005;(45):554-61.

Pissinate JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhaes V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods.* 2008;(336):193-202.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect Dis.* 2001 Sep;1(2):92-100.

PRÓ-SANGUE. Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de São Paulo. [citado em 22 abr 2014]. Disponível em: <http://www.prosangue.sp.gov.br/home/Default.aspx>

Reesink HW. European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfus Clin Biol.* 2005;12(1):1-4.

Remesar MC, Gamba C, Colaianni IF, Puppo M, Sartor PA, Murphy EL, Neilands TB, Ridolfi MA, Leguizamón MS, Kuperman S, del Pozo AE. Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. *Transfusion.* 2009;(49):2352-8.

Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, de Rissio A, et al. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience, 1989-1996. *Clin Infect Dis.* 1999;(29):561-7.

Ribeiro ALT, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.246 -265.

Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Dez; 35(6):551-62.

Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Ferrari TC, Côrrea-Oliveira R, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Análise do desempenho da pesquisa de anticorpos IgG anti-formas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis* (AAPV-IgG), por citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;(36):15-8.

Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Ferrari TCA, Marques MJ, Mayrink W, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2006;(11):156-66.

Sabino EC, Salles NA, Sarr M, Barreto AM, Oikawa M, Oliveira CD, Leao SC, Carneiro-Proietti AB, Custer B, Busch MP; NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Enhanced classification of Chagas serologic results and epidemiologic characteristics of seropositive donors at three large blood centers in Brazil. *Transfusion*. 2010;(50):2628-37.

Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Oliveira CDL, Antunes AP, Menezes MM, Ianni BM, Nastari L, Fernandes F, Patavino GM, Sachdev V, Capuani L, de Almeida-Neto C, Carrick DM, Wright D, Kavounis K, Goncalvez TT, Carneiro-Proietti AB, Custer B, Busch MP, Murphy EL. NHI. National Institute of Health. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013 Mar;127(10):1105-15.

Saéz-Alquezar A, Otani MM, Sabino EC, Santos GR, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang*. 1998;(74):228-31.

Saez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, Pottel H, Stoops E, Zrein M. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J Clin Microbiol*. 2000;(38):851-4.

Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonça MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Saéz-Alquézar A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion*. 1996;(36):969-73.

Salles NA, Sabino EC, Barreto CC, Barreto AM, Otani MM, Chamone DF. The discarding of blood units and the prevalence of infectious diseases in donors at the Pro-Blood Foundation/Blood Center of São Paulo, São Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;13(2-3):111-6.

Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. Arch Med Res. 2001;(32):382-8.

Sánchez CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, Scollo K, Flórez C, Guzmán-Bracho C, Luquetti A, Calvo N, Tadokoro K, Saez-Alquezar A, Palma PP, Martin M, Flevaud L. Avaliação comparativa de 11 testes de diagnóstico para detectar anticorpos do *Trypanosoma cruzi* em bancos de plasma em regiões endêmicas e não endêmicas. J Clin Microbiol. 2014 [citado em 8 jul 2014]. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/early/2014/05/02/JCM.00144-14.abstract>.

Sánchez-Guillén MC, Barnabé C, Guégan JF, Tibayrenc M, Velásquez-Rojas M, Martínez-Munguía J, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Rosas-Ramírez MI, Pérez-Fuentes R. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non endemic area of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;(97):947-52.

Santo AH. Potencial epidemiológico da utilização das causas múltiplas de morte por meio de suas menções nas declarações de óbito, Brasil, 2003. Rev Panam Salud Publica. 2007;22(3):178-86.

Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à doença de Chagas, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2006: estudo usando causas múltiplas de morte. Rev Panam Salud Publica. 2009;26(4):299-309.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas' disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009;104(I):246-51.

Schattschneider W, Lopes ER, Alencar JE, Bienzle U, Feldmeier H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian Patients. Trop Geog Med. 1992;(44):210-8.

Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin América. Clin Microbiol Rev. 2005;(18):12-29.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;(10):75-85.

Schofield CJ, Janin J, Salvatella R. The future of Chagas' disease control. *Trends in Parasitol*. 2006;(22):583-8.

Shah DO, Chang CD, Cheng KY, Salbilla VA, Adya N, Marchlewicz BA, Kirchhoff LV. Comparison of the analytic sensitivities of a recombinant immunoblot assay and the radioimmune precipitation assay for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with Chagas disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;(67):402-5.

Shulman IA, Appleman MD, Saxena S, Hiti AL, Kirchhoff V. Specific antibodies to *T. cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. *Transfusio*. 1997;(37):727-73.

Silveira CS, Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994;27(3):11-22.

Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a brazilian blood bank. *Vox Sanguinis*. 2004;(87): 204-207.

Soussumi, LMT. Estudo da distribuição de doadores reativos para doença de Chagas no hemocentro de Ribeirão Preto, SP [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2004. 107p.

Tafari WL. Immunopathology of Chagas' disease - a historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(I):247-8.

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;(101):463-491.

Teixeira AR, Monteiro OS, Rebelo JM. Emerging Chagas' disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(1):100-12.

Teixeira-Carvalho A, Campos FMF, Geiser SM, Rocha RD, Caldas RG, de Araújo FF, Camargos CR, Azevedo CC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: Application of a multiplexed flow cytometry method for the serological differentiation of Chagas' disease patients among blood donors from endemic leishmaniasis regions. Cytometry A. No prelo 2014.

Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Peralta J. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Patol Clin. 1994;(30):133-9.

Toso AM, Vial FU, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chil. 2011;(139):258-66.

Traganos F. Flow cytometry: principles and applications. Cancer Invest. 1994;(2):239-58.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N, Coura JR, Borges-Pereira J. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996;(34):2143-7.

Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AMS. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. Diag Microbiol Infect Dis. 2001;(39):169-76.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira JF. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six latin american countries. J Clin Microbiol. 2004;42(1):449-52.

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARI. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Inst Med Trop. 1996;38(3):177-85.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Teixeira-Carvalho A, Martins NE, Dias JCP, Rassi A, Luquetti AO, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods*. 2007;(318):102-12.

Wanderley DM, Gonzales TT, Pereira MS, Nascimento RD, Moraes-Souza H. Control of hemotherapy and transfusional Chagas' disease: 1988 and 1990. *Saúde Pública*. 1993;27(6):430-5.

Wendel S. Risco da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2005. 404p.

Yasuda MAS. Relatório final da XV reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e da III reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(1):111-124.

Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, Silveira JF, Umezawa ES. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;(57):229-32.