

Juliana Santos Coelho

Padronização de teste multiparamétrico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, anti-*T.pallidum*, anti-*P.vivax* e anti-*P.falciparum*, empregando a técnica de Dot-ELISA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho, Juliana Santos

Padronização de teste multiparamétrico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, anti-*T.pallidum*, anti-*P.vivax* e anti-*P.falciparum*, empregando a técnica de Dot-ELISA / Juliana Santos Coelho. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antônio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.ELISA 3.Imunoglobulina G 4.Malária
5.Sífilis 6.Estudos epidemiológicos

USP/FM/SBD-035/07

“A mente que se abre a uma idéia jamais voltará ao seu tamanho original...”

Albert Einstein

À DEUS,

Por ser o amigo e fiel companheiro sempre presente na minha vida. Por estar sempre ao meu lado me ajudando e por estar sempre disposto a uma longa conversa.

À VOVÓ LALY

Obrigada por ter me amado tanto, pelas tantas brincadeiras, pelas cosquinhas, pelos queijinhos, pelos docinhos, por ter arrancado de mim tantos sorrisos e ter me feito tão feliz...

IN MEMORIAN

AOS MEUS PAIS IVAN COELHO E GRAÇA COELHO,

O motivo das minhas conquistas, a base que sempre me apóia. Por estarem ao meu lado sempre, ajudar meus sonhos se tornarem reais, pelas palavras de carinho, apoio e incentivo, pelo amor incondicional que me faz sentir a pessoa mais amada do mundo. São vocês a força que me move e os donos do meu amor eterno.

À MINHA IRMÃ DANIELE COELHO

Pelo amor e amizade. Pela capacidade de vencermos obstáculos. Saiba que te amo mesmo quando não consigo me expressar.

À CARMEN ARROYO SANCHEZ,

Pela amizade, incentivo, dedicação, sabedoria, carinho, paciência, e compreensão, durante todos esses anos, desde a elaboração até a conclusão deste trabalho. A mulher que Deus colocou na minha vida pra me ajudar a lutar, crescer e vencer. A pessoa que me ensinou não só ELISAs, interpretação de *papers*, estatísticas e etc... Ensinou-me também a valorizar as coisas certas, ser otimista, ter forças para lutar e enxergar que amigos de verdade, assim como ela, estão sempre presentes nas horas mais difíceis.

À TODA MINHA FAMÍLIA,

Aos meus tios Miguel. Nilce e Nelinho que sempre torceram por mim, mesmo quando ainda era um bebê e por me fazerem parte de suas novas famílias. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

À Irene Soares, Elaine Lemos e Eufrozina Umesawa por cederem os antígenos utilizados neste trabalho.

À Monica Ericó Kudó, pela amizade de longa data, por estar por perto nas horas difíceis e nas horas boas, pela solidariedade, pelo apoio dado por ela na época difícil de adaptação em São Paulo e pelos tantos “galhos quebrados”.

À Amanda Farage Frade, que junto com a Mônica, me apoiou e me acolheu em São Paulo. Sua amizade vai estar sempre comigo.

À Dra. Sandra do Lago Moraes, pelo carinho, sabedoria e amizade, por ser uma pessoa especial e um exemplo a seguir...

À Dra. Guita R. Elefant, pelos conselhos, pela amizade, pela boa vontade no nosso laboratório, companhia e apoio.

À Márcia Otani e Joyce Cotomacio do Laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro de São Paulo, pela atenção, ajuda e dedicação demonstradas por elas e por me receberem sempre tão bem.

À Dra. Sílvia di Santi e funcionários da SUCEN que ajudaram na coleta do material dos pacientes com malária.

Ao meu orientador Dr. Antônio Walter Ferreira pela oportunidade de realizar este trabalho.

Às amigas do laboratório, Fabiana Leoratti, Kelly Kanunfre, Sarita Gobbo, Renata Tunis, Tatiane Salvador, Larissa Costa, Alex Jones, Sandra Beck, Janaína Bezerra, Érika Hoffmann, Patrícia Araújo, Melissa Bastos, pelos momentos de alegria, aprendizado e amizade.

À Hiro Goto, pelos conselhos e todo pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do IMTSP, Paulo Cotrin, Eunice, Paulo Oliveira, Renato, Artur, Ione, Edna, Priante, Fabrício, Beatriz, Ângelo, Érika, Mussya, Sandra, Edite, Sueli, Juliana, Adriano.

À dupla dinâmica, Andréa Ribeiro e Vanessa Burati, amigas do peito que guardam com elas corações iluminados, capazes de espalhar brilho e alegria. Amigas que Deus escolheu a dedo pra conseguir combinar tanto comigo. Amigas que estão sempre do meu lado, me dão muita força nas horas de sufoco e estão sempre me proporcionando muitas risadas.

À Márcia Nascimento e Fernanda Geórgia, minha irmãzinhas, pessoas que mesmo longe estão do meu lado, que sempre têm uma palavra de apoio.

Aos tantos amigos, antigos ou não, que graças à Deus são muitos, e estiveram presentes nessa minha jornada, Flavia Viana, por ser sempre tão boa e paciente, Fabio Colombo, amigo do peito, das horas de estudo, diversão e tantos consertos domésticos, Sylvio Peccinini, por tantas gentilezas, Cristiane Delábio, que vem em acompanhando desde longas datas, Camila Teixeira, e Daniela Burati, pelos tantos momentos de alegria, Amanda Friend, Eduardo Iaki, Carolzona, Amarah, Márcia Makino, Cristiano, Ivo, Isolda, Vanessinha, Bosco e Wilson, por fazerem parte dessa história.

Á tia Rose, tia Lane, Deborah, Rafaela e Henrique, por participarem e apoiarem tantas coisas na minha vida.

Aos tios emprestados Heluiza e Makoto Yamada, pelo carinho, pelas conversas, pelo apoio e por me receberem e me ajudarem logo que cheguei em São Paulo. Pelos passeios e histórias engraçadas do “tio Makó”...nunca esquecerei.

Aos amigos, Melissa Barbery, Manuella Câmara, Ivana Macedo, Bruno Miranda, Aline Ferraz, Suzanne Gualberto, Mary Gualberto, Luana Soares, Leydiane Sobrinho, Melina, Ana Paula Lourenço, Allan Lincoln, Marcos Ribeiro, Janine Ribeiro, Lorena, Verena, Ricardo Teixeira, Roseni, Ailton, Naotó, Patrícia Rosa, Fábio Mello, Antônio Yamada, Regina Pinheiro, Eliza Fernandes, Luiz Henrique Azevedo, Maxiele, que mesmo de longe tenho certeza que torceram por mim.

A todos que de alguma forma me ajudaram a crescer...

Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sob apoio do LIM/HCFMUSP - 48

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
INTRODUÇÃO.....	1
1. Doença de Chagas.....	2
2. Diagnóstico de Doença de Chagas.....	5
3. Sífilis.....	8
4. Diagnóstico de Sífilis.....	12
5. Malária	17
6. Diagnóstico de malária.....	21
7. Dot-ELISA.....	29
8. Testes Multiparamétricos.....	30
JUSTIFICATIVA.....	34
OBJETIVOS.....	36
1. Objetivo Geral.....	37
2. Objetivos Específicos.....	37
CASUÍSTICA E MATERIAL E MÉTODOS.....	38
1. Casuística.....	39
2. Aspectos Éticos da Pesquisa	44
3. Obtenção de Antígeno para o Dot-ELISA.....	45
3.1 <i>Trypanossoma cruzi</i>	45
3.1.1 Preparo do Antígeno EAE.....	45
3.1.2 Preparo do Antígeno TESA.....	46
3.2 <i>Treponema pallidum</i>	47
3.2.1 Preparo do Antígeno (<i>Tp-Zw</i>)	47
3.3 <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i>	49
3.3.1 Manutenção de <i>Plasmodium falciparum</i>	49
3.3.2 Preparo do Extrato Antigênico somático de <i>Plasmodium falciparum</i>	50
3.3.3 Obtenção do Antígeno de <i>Plasmodium vivax</i>	52
4. Testes utilizados como referência.....	52
4.1 Anticorpos Anti - <i>T. cruzi</i>	53
4.1.1 TESA-Blot	53

4.1.2 Anticorpos Anti - <i>T. pallidum</i>	54
4.1.2.1 FTA-Abs	54
4.1.3 Anticorpos Anti - <i>P. falciparum</i> e Anti - <i>P. vivax</i>	55
4.1.3.1 Teste Imunoenzimático (ELISA) com <i>Pf-Zw</i>	55
4.1.3.2 Teste Imunoenzimático (ELISA) com <i>Pv-MSP1₁₉</i>	56
4.2 Padronização do Dot-ELISA.....	57
4.3 Padronização do Dot-ELISA-Multi.....	61
4.4 Análise Estatística.....	63
RESULTADOS.....	64
1. Padronização do Dot-ELISA.....	65
1.1 Dot-ELISA TESA.....	65
1.2 Dot-ELISA EAE.....	67
1.3 Dot-ELISA <i>Tp-Zw</i>	67
1.4 Dot-ELISA <i>Pf-Zw</i>	68
1.5 Dot-ELISA <i>Pv-MSP1₁₉</i>	69
2. Padronização do Dot-ELISA-Multi.....	70
2.1 Sensibilidade e Positividade do Dot-ELISA-Multi.....	70
2.1.1 Anticorpos Anti - <i>T. cruzi</i>	70
2.1.2 Anticorpos Anti - <i>T. pallidum</i>	71
2.1.3 Anticorpos Anti - <i>P. falciparum</i> e Anti - <i>P. vivax</i>	72
2.2 Especificidade do Dot-ELISA-Multi.....	72
2.3 Dot-ELISA-Multi X Testes utilizados como Referência.....	74
2.3.1 Anticorpos Anti - <i>T. cruzi</i>	74
2.3.2 Anticorpos Anti - <i>T. pallidum</i>	74
2.3.3 Anticorpos Anti - <i>P. falciparum</i> e Anti - <i>P. vivax</i>	75
2.4 Dot-ELISA-Multi nos subgrupos de malária.....	75
2.5 Relação entre Anticorpos Específicos Anti - <i>P. vivax</i> e Anti - <i>P. falciparum</i> e Variáveis Epidemiológicas.....	79
DISCUSSÃO.....	82
CONCLUSÕES.....	92
ANEXOS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” – ensaio imunoenzimático
FAN	Fator anti-núcleo
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
R	Reativo
NR	Não reativo
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
IR	Índice de Reatividade
kDa	kilodalton
LR	Limiar de Reatividade
M	Molar
Med	Mediana
mg	miligrama
mL	mililitro
MSP1	Proteína 1 de superfície de merozoíto
N	Normal
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
P. f	Plasmodium falciparum
P.v	Plasmodium vivax
PBS	“Phosphate Buffer Saline” – Solução salina tamponada com fosfato
PvRBP-1	“Plasmodium vivax reticulocyte binding protein-1”
PvRBP-2	“Plasmodium vivax reticulocyte binding protein-2”
qsp	quantidade suficiente para
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TA	Temperatura ambiente
µL	microlitro
QBC	“Quantitative Buffy Coat”
DST	Doença sexualmente transmissível
SP	Sífilis primária
SL	Sífilis latente
ST	Sífilis terciária
SLT	Sífilis latente tardia
SS	Sífilis secundária
VDRL	“Venereal Disease Research Laboratory”
RPR	“Rapid Plasma Reagen”
FTA-ABS	“Fluorescent Treponemal Antibody – Absortion”
FTA-ABS DS	“Fluorescent Treponemal Antibody – Absortion double-staining”
TPHA	Microhemaglutinação com hemácias com antígenos de <i>T. pallidum</i>
TPPA	Aglutinação de partículas recobertas com antígenos de <i>T. pallidum</i>
WB	Western blotting
RDT	“rapid diagnostic tests”
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características parasitológicas e epidemiológicas dos pacientes e residentes em área endêmica, estudados no grupo de área endêmica de malária.	43
Tabela 2	.Resumo das variáveis estudadas na padronização do Dot-ELISA	59
Tabela 3	Resumo das condições estudadas na padronização do Dot-ELISA.	60
Tabela 4	Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de diferentes lotes de antígeno TESA no Dot-ELISA, frente a soros positivos (N = 52) e negativos (N = 100).	66
Tabela 5	Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno EAE no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 16) e negativos (N = 100).	67
Tabela 6	Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno Tp-Zw no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 48) e negativos (N = 98).	68
Tabela 7	Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno Pf-Zw no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 24) e negativos (N = 100).	69
Tabela 8	Desempenho diagnóstico do Dot-ELISA-Multi para detecção de anticorpos IgG específicos anti-T. cruzi, anti-T. pallidum, anti-P. vivax e anti-P. falciparum. Os resultados são apresentados em número de pacientes positivos (n) e sensibilidade ou positividade (%).	73
Tabela 9	Desempenho diagnóstico do Dot-ELISA-Multi na detecção de anticorpos IgG específicos anti-P. vivax e anti-P. falciparum. Os resultados são apresentados em número de pacientes positivos (n) e sensibilidade ou positividade (%).	77
Tabela 10	Sensibilidade (%) do ELISA e Dot-ELISA-Multi para anticorpos IgG em pacientes com infecção por P. falciparum e/ou P. vivax	78
Tabela 11	Associação entre testes sorológicos e dados epidemiológicos em amostras de pacientes com gota espessa negativa e relato de malárias anteriores	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática das reações na membrana de 63 nitrocelulose sensibilizadas com EAE e TESA de *T. cruzi*, PvMSP1₁₉ de *P. vivax*, Pf-Zw de *P. falciparum* e Tp-Zw de *T. pallidum* do Dot-ELISA-Multi. A tira 1 mostra reações positivas para os antígenos EAE, TESA, Pv-MSP-1₁₉ e Pf-Zw. A tira 2 mostra reações positivas para EAE, TESA e Tp-Zw.

RESUMO

Coelho JS. Padronização de teste multiparamétrico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, anti-*T.pallidum*, anti-*P.vivax* e anti-*P. falciparum*, empregando a técnica de Dot-ELISA [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2006.

Neste trabalho foi desenvolvido um Dot-ELISA capaz de detectar anticorpos anti-*Plasmodium vivax*, anti-*Plasmodium falciparum*, anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Treponema pallidum*, simultaneamente. O teste foi padronizado e aplicado em amostras de pacientes com malária, doença de Chagas e sífilis e comparado com testes de referência. Foi utilizado no estudo 52 amostras de pacientes com doença de Chagas, 43 pacientes com sífilis, 103 indivíduos com infecção presente (primo-infectado e não primo-infectados) ou passada de malária, indivíduos com anticorpos heterólogos, 30 indivíduos com leishmaniose 100 indivíduos saudáveis. O Dot-ELISA-Multi apresentou 100% de especificidade para todos os antígenos nas amostras de indivíduos saudáveis e com anticorpos heterólogos, com exceção do antígeno TESA que obteve 99%. A sensibilidade obtida foi de 100% em indivíduos chagásicos e 88% em pacientes com sífilis. Em indivíduos com malária a sensibilidade obtida foi de 90% para PvMSP1₁₉ (antígeno de *P. vivax*) e 47% para Pf-Zw (antígeno de *P. falciparum*). A positividade do teste em indivíduos não parasitados com histórico de malária foi de 92%. Nas amostras de malária observou-se que em indivíduos que tinham tido último episódio de *P. vivax*, associação negativa foi observada entre o tempo passado desde o último episódio e reatividade de Dot-ELISA-Multi PvMSP1₁₉, e associação positiva entre o número de episódios de malária e reatividade de Dot-ELISA-Multi Pf-Zw. Indivíduos cujo o último episódio foi por *P. falciparum*, o Dot-ELISA-Multi Pf-Zw apresentou associação positiva com o número de episódios ocorridos. O comparado com os testes de referência utilizados apresentou um nível muito bom de concordância para TESA, EAE, PvMSP1₁₉ e um nível bom de concordância para Pf-Zw.

Descritores: 1. doença de Chagas 2. Dot-ELISA 3. Imunoglobulina G 4. malária 5. Teste multiparamétrico 6. sífilis

SUMMARY

Coelho JS. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease and syphilis specific IgG antibodies. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2006.

In the present study, a Dot-ELISA was assembled to test antibodies against *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *Treponema pallidum* and was standardized and evaluated in serum samples from patients with malaria, Chagas disease and syphilis, in comparison with reference tests. The study was carried out on serum samples from 52 patients with chronic Chagas disease, 103 individuals with current (parasitemic) or past malaria (aparasitemic), 43 patients with syphilis, 30 with leishmaniosis, 21 individuals with heterologous antibodies and 100 blood donors. The diagnostic performance of Dot-ELISA-Multi for serum samples from patients with heterologous antibodies and from healthy blood donors, an overall 100% specificity was obtained for all antigens but TESA. A 100% sensitivity was observed in serum specimens from chronic-chagasic patients and 88% in serum specimens from syphilis patients. For malaria samples, the positivity was 90% for PvMSP1₁₉ and 47% for Pf-Zw antigen. In past malaria individuals, positivity was 92%. Sera from subjects who had had a *P. vivax*-malaria last episode presented negative association between time elapsed since their last malaria episode and results from Dot-ELISA-Multi PvMSP1₁₉; while positive association was observed between number of malaria episodes and results from Dot-ELISA-Multi Pf-Zw. For individuals who had had a *P. falciparum*-malaria last episode, Dot-ELISA-Multi Pf-Zw results showed positive association with number of malaria episodes only. Altogether, concerning the reactivity of the five antigens of the Dot-ELISA-Multi, as compared with their respective reference tests, we have observed a very good level of concordance for TESA, EAE, PvMSP1₁₉ and for Tp-Zw and a good level for Pf-Zw.

Descriptors: 1. Chagas disease 2. Dot-ELISA 3. IgG antibodies 4. Malaria 5. Multiparametric assay 6. Syphilis

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Na natureza, *T. cruzi* é encontrado em hospedeiros invertebrados (insetos pertencentes à subfamília Triatomina, família Reduviidae, ordem Hemiptera) e em hospedeiros vertebrados (homem e outros mamíferos), podendo ser transmitido por mais de 100 espécies de insetos da família Reduviidae (Kelly, 2000).

A doença tem ampla distribuição na América, estando presente em 18 países do continente. Estimativas indicam uma prevalência de infecção de 13 milhões de pessoas no mundo, com cerca de três milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200.000 casos (Morel e Lazdins, 2003).

No Brasil, a doença de Chagas apresentava uma elevada incidência no final da década de 70, estimada em cerca de 100 mil casos novos por ano. Hoje, a doença encontra-se sob controle, devido à estratégia de monitoramento entomológico, utilização de inseticidas e melhorias habitacionais (Ministério da Saúde, 2006). Apesar da região Amazônica não ser endêmica, Luitgards-Moura et al. (2005) mostraram que em Rondônia

existem todos os elos da cadeia de transmissão da doença de Chagas, que permitem sua instalação na ausência de vigilância.

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser adquirida por outros mecanismos, tais como: transfusões sanguíneas, transmissão ocasional da mãe chagásica para o filho, através da placenta (Ministério da Saúde, 1989) e surtos episódicos de transmissão oral (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005; Ianni e Mady, 2005).

Em áreas urbanas, a transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue e derivados apresenta grande importância, como consequência da migração de populações de áreas endêmicas para centros industrializados em busca de trabalho (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

Em mulheres grávidas, a transmissão vertical da doença de Chagas, no atual estágio de controle vetorial e transfusional, é o principal mecanismo de transmissão no Brasil (1%) (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

De acordo com Coura et al. (2002), mais da metade dos casos agudos de doença de Chagas ocorridos na região Amazônica, entre 1968 e 2000, são atribuídos a microepidemias decorrentes de transmissão oral da infecção. Segundo o Ministério da Saúde, ocorreram surtos nos estados do Amapá e Pará em 2005 e 2006, respectivamente.

Visando avaliar o impacto das ações de prevenção e controle da doença de Chagas, foi realizado em todo o país um inquérito sorológico em crianças de 0 a 5 anos, que evidenciou a interrupção da transmissão pelo *Triatoma infestans*. Desse modo, em junho de 2006, o Brasil recebeu da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no país (Ministério da Saúde, 2006).

A doença de Chagas pode se apresentar sob as formas clínicas aguda, indeterminada e crônica, com diferentes sintomas para cada fase (Andrade, 1999. CDC, 2006a).

A fase aguda ocorre em 1% dos casos, geralmente em crianças, podendo levar a lesões cerebrais severas e à morte. Os sintomas desaparecem entre 4 e 8 semanas, mesmo sem tratamento. A fase indeterminada ocorre aproximadamente 10 semanas após a infecção, podendo durar vários anos. Nesta fase, os indivíduos são soropositivos e/ou com exame parasitológico positivo, sem a presença de sintomas (Andrade, 1999, CDC, 2006a).

A fase crônica ocorre em mais de um terço dos infectados e aparece após 10 a 40 anos de infecção, com lesões irreversíveis que podem atingir o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico (Andrade, 1999, CDC, 2006a).

2. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS

No diagnóstico da fase aguda de doença de Chagas são utilizados métodos diretos para pesquisa de tripanossomos na corrente sanguínea. Caso esses métodos não consigam detectar o parasito, devem ser utilizados métodos de concentração, tais como micro-hematócrito e QBC (*Quantitative Buffy Coat*) que apresentam 80 a 90% de sensibilidade.

O diagnóstico molecular pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem apresentado resultados promissores, permitindo que esta metodologia seja utilizada como teste confirmatório em casos de sorologia inconclusiva; no controle pós-terapêutico; em estudos comparativos com novas técnicas sorológicas ou parasitológicas e na detecção do nível de parasitemia (técnica quantitativa) em imunodeprimidos, visando intervenção terapêutica ou profilática precoce (Marcon et al., 2002; Galvão et al., 2003; Portela-Lindoso et al., 2003).

Em casos onde haja forte suspeita de fase aguda e os exames parasitológicos resultem negativos, o diagnóstico molecular pode ser associado à pesquisa de anticorpos IgM (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

Borges-Pereira et al. (2005) utilizaram a PCR em inquérito realizado no Piauí, obtendo sensibilidade de 74,5%, significativamente maior que a do xenodiagnóstico. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos

que comparam a PCR com outros métodos diretos para pesquisa de tripanossomos na corrente sanguínea (Gomes et al., 1999, Castro et al., 2002).

O diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico, associando-se um teste de elevada sensibilidade a outro de alta especificidade. Como na fase crônica a parasitemia é subpatente, os métodos parasitológicos convencionais são de baixa sensibilidade e a PCR é indicada em casos de sorologia duvidosa, controle de cura e em áreas onde também exista infecção por *T. rangeli* (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

Em casos suspeitos de transmissão vertical, é importante a confirmação do diagnóstico sorológico da mãe, seguido do exame parasitológico do recém-nascido. Filhos de mãe chagásica com exame parasitológico negativo devem retornar 6 a 9 meses após o nascimento, a fim de realizarem testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. Em função do elevado número de exames falso-negativos em caso de transmissão congênita, não se recomenda a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgA e IgM (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

O emprego de extrato de formas epimastigotas (EAE) forneceu resultados de alta sensibilidade para o diagnóstico na fase crônica da doença, sendo indicado na triagem, por apresentar limitações na especificidade, podendo reagir com soros de pacientes com leishmaniose

(Chiller et al., 1990; Velásquez et al., 1993; Umezawa et al., 1996a; 1999; Sánchez et al., 2001; Malan et al., 2006).

Visando aumentar a especificidade dos testes sorológicos, tem sido recomendada a utilização de antígenos purificados, recombinantes e sintéticos. O emprego de apenas um antígeno específico pode acarretar diminuição da sensibilidade e, em consequência, a tendência é de se empregar vários desses antígenos. Umezawa et al. (1999) avaliaram frações semipurificadas de formas epimastigotas de *T. cruzi* e concluíram que a utilização combinada de algumas dessas frações resultavam em testes sensíveis e específicos no diagnóstico da doença de Chagas. Luquetti et al. (2000) obtiveram 99,3% de sensibilidade e 96,2% de especificidade em teste de precipitação em gel utilizando partículas de polímeros coloridas e sensibilizadas com três peptídeos sintéticos diferentes de *T. cruzi*. Gomes et al. (2001) avaliaram um teste ELISA com antígenos recombinantes, obtendo 100% de sensibilidade e especificidade. Em amostras com sorologia inconclusiva, obtiveram resultados concordantes com a clínica. Umezawa et al. (2004) combinaram três antígenos recombinantes (JL8, MAP e TcPo), obtendo melhores índices de especificidade (99,3%) que com extratos obtidos de formas epimastigotas de *T. cruzi* (95,8%).

O antígeno de excreção e secreção de formas tripomastigotas (TESA) de *T. cruzi* tem se mostrado mais sensível na detecção de anticorpos IgM, tanto pela técnica de *Western blotting* (Umezawa et al. 1996a) como pela de ELISA (Umezawa et al. 2001) quando comparado ao extrato alcalino das

formas epimastigotas (EAE). Deste modo, o antígeno TESA apresentou 100% de sensibilidade por ambos os testes, tanto nos casos crônicos (pesquisa de IgG) como nos agudos e congênitos (pesquisa de IgM). Além disso, apresentou 100% de especificidade frente a amostras de indivíduos não chagásicos saudáveis e com outras patologias, incluindo leishmaniose.

Nakazawa et al. (2001) empregaram o teste ELISA com antígeno TESA, obtendo 100% de sensibilidade em pacientes crônicos de doença de Chagas e 100% de especificidade em pacientes com outras doenças parasitárias.

3. SÍFILIS

Sífilis faz parte do grupo das doenças sexualmente transmissíveis (DST), sendo causada pelo espiroqueta *Treponema pallidum*, pertencente à ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae, gênero *Treponema*, espécie *pallidum*, subespécie *pallidum*. Além da transmissão por contato sexual, pode ocorrer contaminação acidental entre profissionais de saúde, em usuários de drogas endovenosas, em transfusão de sangue e por via congênita.

Ocorrências de epidemias de sífilis são relatadas em várias partes do mundo, mostrando que a doença ainda constitui um importante problema de saúde mundial (Norris et al., 1993).

Em países desenvolvidos, a doença apresenta índices menores. No Canadá, a incidência de sífilis entre os anos de 1995 a 1997 chegou a 0,4 para cada 100.000 habitantes. Nos Estados Unidos, durante o mesmo período, a incidência chegou a 3,2 para cada 100.000 habitantes. Mesmo nesses países, está associada à pobreza, instabilidade geográfica e dificuldade de acesso ao sistema de saúde (CDC, 1998).

Em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 12 milhões o número de novos casos de sífilis em adultos em países em desenvolvimento. A maior incidência ocorreu no sul e sudeste da Ásia, com 48% dos casos. Na Rússia, houve uma epidemia em 1996, cujas causas incluem aumento da pobreza, desemprego, declínio da assistência governamental à saúde pública e aumento dos movimentos de migração populacional com a abertura das fronteiras (Singh e Romanowski, 1999).

No Brasil, somente sífilis congênita é de notificação compulsória. Sua detecção deve ser vista como "evento marcador" cuja importância transcende sua ocorrência individual, ou seja, cada caso representa uma falha tanto de programas de controle de DST, na população geral, quanto do sistema de atenção pré-natal.

De acordo com o Boletim Epidemiológico, DST, entre 1998 e 2006, o número de casos notificados de sífilis congênita variou de 2840 em 1998 a 5710 em 2005. A incidência por mil nascidos vivos, aumentou de 0,9 em 1998 até 1,9 em 2005, mostrando um aumento percentual no decorrer dos

últimos anos, que pode ser devido a falhas nos programas de controle ou à maior eficiência na notificação.

Sífilis apresenta várias fases ou estágios: sífilis primária, secundária, latente (recente e tardia) e terciária (Larsen et al., 1995). Os sinais e sintomas são numerosos e complexos, variando conforme a gravidade da infecção e a fase da doença (Brown et al., 2003).

Sífilis primária (SP) caracteriza-se pelo surgimento do protossifiloma ou cancro primário que desaparece espontaneamente em 1 a 4 meses. Sífilis secundária (SS) inicia-se meses após o desenvolvimento do cancro em cerca de 25% de indivíduos com SP não tratada adequadamente. Na maioria das vezes, a pele é mais afetada apresentando roséolas, lesões mucosas e linfadenopatia generalizada, por vezes reação meníngea, que também cedem espontaneamente após período de 2 a 6 semanas (Brown et al., 2003, Little, 2005).

Em sífilis latente, os sinais e sintomas clínicos desaparecem e a doença progride de uma manifestação de infecção aguda para crônica. Infecções com menos de 1 ano de duração são definidas por critérios epidemiológicos, como sífilis latente recente (SLR) em que podem ocorrer recaídas para sífilis secundária e infecção recorrente (Brown et al., 2003, Little, 2005).

Segue-se a fase de sífilis latente tardia (SLT), que dura de 5 a 20 anos ou mais da infecção inicial, podendo dar lugar a sífilis terciária (ST), que é sintomática, com lesões destrutivas, cardiovasculares ou do sistema

nervoso central, com demência, psicose, *tabes dorsales*, ou com o aparecimento de gomas na pele, ossos ou vísceras. (Lemos, 2002, Brown et al., 2003, Little, 2005).

Neurossífilis caracteriza-se por lesões no sistema nervoso central, atingindo principalmente estruturas ectodérmicas resultando psicose, demência, *tabes dorsales*. Ocorre principalmente em sífilis tardia, após longo período de latência, como forma terciária da infecção. Também pode ocorrer em pacientes com histórico de sífilis não tratada (incidência de 10%), em infectados por HIV ou em outras situações que comprometam o estado imunológico do indivíduo (Vargas et al., 2000, Brown et al., 2003).

Sífilis congênita ocorre em recém-nascidos de parturientes portadoras de sífilis (SP ou SS), não tratada ou insuficientemente tratada, havendo nestes casos 50% ou mais de probabilidade de transmissão placentária. Também pode ocorrer transmissão de mães com SL ou ST. Como consequência, pode ocasionar abortamento espontâneo, morte fetal e neonatal, prematuridade e danos à saúde do recém-nascido (Rodrigues et al., 2004). Na maioria dos casos, as crianças diagnosticadas com a doença são assintomáticas ao nascer, contudo os sintomas aparecem do terceiro ao décimo quarto mês de vida e as manifestações clínicas são inespecíficas tornando difícil o diagnóstico (Lago e Garcia, 2000).

4. DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS

O diagnóstico de sífilis baseia-se em sinais e sintomas clínicos, exames de microscopia com evidenciação do *T. pallidum* nas lesões ou, através de testes sorológicos (treponêmicos e não-treponêmicos) que apresentam diferenças de sensibilidade e especificidade de acordo com o antígeno utilizado e a fase clínica da doença (Brown et al., 2003, Little, 2005).

Em SP e ST a sensibilidade dos testes sorológicos é menor. Na fase primária da doença o diagnóstico clínico é de grande importância, pois a sensibilidade dos testes sorológicos varia de 78% a 86%, para os testes não-treponêmicos e de 76% a 84%, para os testes treponêmicos. Durante a ST os testes não-treponêmicos e treponêmicos apresentam sensibilidade de 71% a 73% e de 94% a 96%, respectivamente. Na fase secundária da doença são esperados 100% de sensibilidade para ambos os tipos de testes (Brown et al., 2003, Wheeler et al., 2004; Marangoni et al., 2005).

T. pallidum pode ser detectado em raspados e exsudatos de lesões recentes (fases primária e secundária), ou aspirados de nódulos linfáticos, pela técnica de microscopia em campo escuro, pesquisa após coloração pela prata, PCR ou RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase) e em biópsias de tecido (Little, 2005; Ministério da Saúde, 2006 - www.aids.gov.br).

Os testes não-treponêmicos utilizam a cardioplipina combinada com lecitinas e colesterol, formando um antígeno que reage com anticorpos IgM e IgG. Presente em numerosos tecidos orgânicos, a cardioplipina é de especificidade limitada, porém de alta sensibilidade, apresentando pronta resposta à terapêutica (Larsen et al., 1995; Little, 2005).

Os dois testes não-treponêmicos mais utilizados são o teste cardioplipínico do VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) e o teste RPR (*Rapid Plasma Reagen*). Testes não-treponêmicos são quantificáveis e podem ser utilizados no acompanhamento do tratamento. A reatividade surge 1 a 4 semanas após o aparecimento do cancro na SP, podendo ocorrer resultados falso-negativos em alguns casos de SLT e ST (Larsen et al., 1995; Little, 2005).

Os testes treponêmicos se baseiam na detecção de anticorpos contra componentes de *T. pallidum*. São muitas vezes utilizados para confirmar resultados positivos dos testes não-treponêmicos, não podendo ser empregados para acompanhamento de tratamento, visto que podem permanecer reagentes por toda a vida, mesmo após a cura do indivíduo (Little, 2005).

Utilizam-se testes de imunofluorescência indireta, como o FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody – Absortion*) e FTA-ABS DS (*Fluorescent Treponemal Antibody – Absortion double-staining*); teste de aglutinação, como o de microhemaglutinação com hemácias (TPHA) e aglutinação de partículas recobertas com antígenos de *T. pallidum* (TPPA) e testes

imunoenzimáticos, como ELISA. (Little, 2005). Em estudo realizado por Rotta (2005), o FTA-ABS apresentou sensibilidade de 99,5% e especificidade de 88,7%, fornecendo resultados falso-positivos em doenças autoimunes. O autor sugere a utilização de reações de hemaglutinação como testes confirmatórios, principalmente se o laboratório não estiver equipado com microscopia de fluorescência.

Os testes imunoenzimáticos podem ser realizados com extratos de *T. pallidum* fixados a suportes, como microesferas ou cavidades de placas plásticas (ELISA). O uso de antígeno recombinante de *T. pallidum* mostrou 100% de sensibilidade em amostras de painel e 99,8% de especificidade na triagem de Banco de Sangue, mostrando-se mais sensível que o TPHA e VDRL (Zrein et al., 1995).

A técnica de *Western blotting* (WB) tem importante papel na diferenciação da reação sorológica falsa da verdadeiramente positiva. As frações mais importantes na identificação de anticorpos específicos são as de massas moleculares de 47 KDa, 17 KDa e 15 KDa (Young et al., 1994, Sambri, 2001). Elevados índices de especificidade e sensibilidade foram encontrados em vários estudos. Byrne et al (1992) obtiveram melhores índices sensibilidade e especificidade com a técnica de WB em relação ao FTA-Abs. Lemos (2002) sugere a utilização do WB para pesquisa de anticorpos IgG como confirmatório para sífilis, de modo semelhante ao WB que é utilizado como confirmatório para HIV. Quando utilizado para a

pesquisa de anticorpos IgM, o WB apresenta um grande valor diagnóstico em sífilis congênita (Larsen et al., 1995).

Antígenos de *T. pallidum* também têm sido aplicados em testes rápidos imunocromatográficos e representam auxílio diagnóstico de extrema importância pela possibilidade de leitura imediata. Sato et al. (2003) avaliaram um teste rápido imunocromatográfico de procedência comercial para detectar anticorpos específicos contra antígenos treponêmicos, obtendo 93,6% de sensibilidade e 95,2% de especificidade. O ensaio utiliza como antígeno um complexo coloidal treponema-selênio, não necessita de equipamentos e a leitura é feita em 15 minutos sendo útil para aplicação em pesquisa de campo ou em situações onde é necessário um rápido diagnóstico.

Hagedorn et al. (2002) avaliaram um imunoensaio multiparamétrico com diferentes antígenos recombinantes e polipeptídeos sintéticos derivados de proteínas de *T. pallidum*, obtendo 100% de sensibilidade e 99,3% de especificidade. O ensaio foi comparado com FTA-Abs e TPHA, sendo útil para o emprego como teste confirmatório.

Sato et al. (2004) utilizaram a técnica de *dot* com antígenos recombinantes de *T. pallidum*, cepa Nichols em amostras com diagnóstico clínico e sorológico de sífilis obtendo 95,1% de sensibilidade. O ensaio obteve 94,7% de especificidade quando testado em amostras de doadores de sangue e soros reagentes com outras doenças.

Em neurosífilis ocorre a produção de anticorpos intratecais, aumento de proteína e aumento de leucócitos no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Brown et al., 2003). O VDRL é positivo em cerca de 90% dos pacientes sintomáticos e 10% dos não sintomáticos, apresentando 99,8% de especificidade (Larsen et al., 1985). Testes treponêmicos mostram-se reagentes mesmo sem comprometimento neurológico, devido à passagem de anticorpos IgG pela barreira hematoencefálica e, por isso, níveis de anticorpos do soro e LCR devem ser comparados (Brown et al., 2003).

O diagnóstico de sífilis congênita pode ser feito através da pesquisa do treponema em raspados de lesões cutâneas, mucosas ou na secreção nasofaríngea, empregando-se microscopia em campo escuro, e pela evidenciação do treponema no LCR. Em caso de neurosífilis congênita, recomenda-se a PCR. Os testes cardiolipínicos possuem valor limitado devido à transferência passiva de IgG materno, cujo nível tende a diminuir ou se negatizar, após alguns meses; porém, a negatização não exclui a infecção. Os testes treponêmicos, para pesquisa de IgG, também possuem valor limitado devido à transferência passiva de IgG materno. A pesquisa de IgM tem grande valor na sífilis congênita; porém, podem ocorrer resultados falsos positivos, devido à interferência de fator reumatóide, e até 40% de resultados falsos negativos, devido à competição com IgG presente no soro. A utilização da técnica de *WB* para detecção de anticorpos IgM mostrou maior sensibilidade que os demais testes sorológicos para a pesquisa de sífilis congênita (Lemos, 2002).

5. MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, classe Sporozoa, ordem Coccidiida, subordem Hemosporidiidea, família Plasmodiidae, transmitida na natureza pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados. A infecção pode ser adquirida também por transfusão sanguínea, uso compartilhado de agulhas contaminadas ou via congênita, no momento do parto (Cimerman, 1999).

Quatro espécies podem parasitar o homem, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*.

No final de 2004, 107 países e territórios possuíam áreas de risco para a transmissão de malária, onde 3,2 bilhões de pessoas estavam expostos à infecção (OMS, 2005). Estima-se que ocorram entre 350 e 500 milhões de casos clínicos por ano, sendo a maioria causada por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, que são as espécies de maior distribuição no mundo (Korenromp, 2004).

O risco de aquisição de malária não é uniforme dentro de um mesmo país e, freqüentemente, é desigual para locais situados em uma mesma região, além de sofrer variações com as estações do ano e ao longo do tempo. A situação da malária parece estar piorando, especialmente nas "fronteiras" de desenvolvimento econômico da América do Sul e do Sudeste

da Ásia. Os problemas são mais graves em áreas de conflitos armados e de deslocamentos de refugiados (Ministério da Saúde, 2006).

P. falciparum é a espécie mais patogênica causando uma mortalidade estimada em mais de um milhão de pessoas, contribuindo indiretamente para outras mortes, principalmente em crianças abaixo de 5 anos e mulheres grávidas, através do sinergismo com outras doenças e infecções, entre elas HIV/AIDS (OMS, 2005). Cerca de 60% dos casos clínicos de malária e 80% das mortes ocorrem na África ao Sul do Saara (OMS, 2003). A malária mata, em média, uma criança a cada 30 segundos.

Estima-se que mais de 200 mil crianças morram por ano devido à infecção por *Plasmodium sp* durante a gravidez. Estudos mostraram que a associação da malária e HIV durante a gestação diminui significativamente a imunidade da gestante aumentando a gravidade da malária (Mount et al, 2004). Durante a gravidez a malária é um risco tanto para o bebê quanto para a mãe e deve ser considerada potencialmente grave, especialmente se a mulher for primigesta, o agente etiológico for o *P. falciparum* e/ou quando a mulher não tiver história de malária prévia (Jarude et al, 2003).

Dados de 2001 (Mendis et al., 2001) estimavam que 70 a 80 milhões dos casos de malária no mundo eram devidos a *Plasmodium vivax*, principalmente no Oriente Médio, Ásia e Oeste do Pacífico (80 a 90%), América do Sul e Central (10 a 15%). Provavelmente, de 10 a 20% dos casos de malária *vivax* no mundo ocorrem na África. No leste e sul da África, *P. vivax* representa 10% dos casos e na África Central e Oeste, menos de

1% dos casos. Excluindo-se a África, *P. vivax* é responsável por 56% dos casos de malária.

P. ovale é encontrado principalmente na África Ocidental, podendo ocorrer recaídas de 4 a 5 anos após a primeira infecção. *P. malariae* tem uma distribuição mundial, podendo ocorrer recaídas até 20 anos após a primeira infecção (Institut Pasteur, 2006).

No Brasil, há três espécies de plasmódios infectando o homem, *P.falciparum*, *P.vivax* e, eventualmente, *P.malariae*. Em torno de 99,5% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal, onde a espécie predominante é *P. vivax*. Entretanto, no período de 1999 a 2004 houve um aumento na proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 23,7%; este aumento é preocupante, pois a malária *falciparum* é a responsável pela grande maioria das formas graves e dos óbitos (Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2005).

Nos estados das demais regiões, os casos registrados são quase totalmente importados da região Amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão. Em 2001 e 2002 foi observada uma tendência de queda do número de casos de malária, porém a partir de 2003 houve uma reversão, chegando a 597.907 casos notificados em 2005 (Ministério da Saúde, 2006).

Embora o estado de São Paulo seja considerado área sem transmissão ativa de malária, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), tem detectado anualmente casos esporádicos de malária autóctone. Branquinho et al (1997) verificaram a infecção em anofelinos na

região de Mata Atlântica, rica em plantas da família *Bromeliaceae*, criadouros de formas imaturas de anofelinos. Embora tenha sido encontrado um baixo nível de infecção, a alta densidade destes mosquitos e sua voracidade (picam durante as 24 h do dia) poderiam compensar a baixa porcentagem de espécimes infectados.

Os parasitos do gênero *Plasmodium* apresentam um ciclo de vida complexo que se desenvolve em um hospedeiro vertebrado (ciclo assexuado – pré-eritrocítico e eritrocítico – responsável pelas manifestações clínicas) e um invertebrado (ciclo sexuado – no mosquito). Em *P. vivax* e *P. ovale* existe um estágio dormente (hipnozoíto) que pode persistir no fígado e voltar a invadir as hemácias, causando recaídas.

O ciclo eritrocítico é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. Em indivíduos não-imunes, o paroxismo malárico é a principal característica clínica da malária, constituindo-se por febre, calafrios e cefaléia, como consequência da ruptura das hemácias infectadas com esquizontes, pois ocorre a exposição do material do parasito ao sistema imune e outros sistemas fisiológicos do hospedeiro.

Em infecções naturais, os primeiros dois ou três ciclos de ruptura dos esquizontes no sangue podem ser assintomáticos. Os sinais e sintomas associados com o paroxismo são específicos para cada espécie de plasmódio (Karunaweera et al., 2003).

Nas infecções produzidas por *P. falciparum*, podem ocorrer formas graves em indivíduos não-imunes, gestantes e crianças, com o

comprometimento do cérebro, rins, pulmões, fígado e sangue. Em contraste, infecções por *P. vivax* não apresentam, na maioria dos casos, sérios riscos ou complicações, e o paroxismo ocorre em intervalos de 48 horas (Karunaweera et al., 2003).

Em circunstâncias raras e pouco conhecidas, a malária *vivax* pode se apresentar em formas graves e até letais (Mendis et al., 2001). Esses casos estão associados a alterações hematológicas (plaquetopenia, coagulação intravascular disseminada, sangramento), lesões pulmonares, alterações renais, ruptura esplênica, malária cerebral, entre outras (Alecrim, 2000).

6. DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

O método microscópico (gota espessa e extensão coradas, geralmente por Giemsa) é o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de malária. O método é satisfatoriamente sensível e específico e permite a identificação da espécie e o estágio de desenvolvimento do plasmódio, fornece informação sobre a viabilidade do parasito e é quantificável. Contudo, requer alto treinamento e experiência do microscopista e pode ter a sensibilidade comprometida em baixas parasitemias. (Ávila e Ferreira, 2001, CDC, 2006).

Testes imunocromatográficos para a pesquisa de antígenos derivados de plasmódios são uma alternativa à microscopia. São chamados de testes rápidos (RDT – *rapid diagnostic tests*), pois os resultados são obtidos após 2 a 10 minutos (CDC, 2006). A maioria baseia-se em captura, com anticorpos monoclonais, de antígenos abundantes em todos os estágios do parasito, tais como proteína rica em histidina 2 (HRP-2) de *P. falciparum*, enzima lactato-desidrogenase específica (pLDH) ou enzima aldolase da via glicolítica, encontrada em todas as espécies de *Plasmodium* (Moddy, 2002). Em geral, possuem a mesma ou menor eficiência que a gota espessa (Murray, 2003; Belizario et al., 2005).

Ávila et al. (2002) compararam o ensaio imunocromatográfico que detecta HRP-2 de *P. falciparum* com a gota espessa. Os resultados mostraram que o teste imunocromatográfico foi capaz de detectar 71 parasitos/mm³ e a gota espessa, 12 parasitos/mm³.

Em 2000, a OMS elaborou um documento intitulado *New Perspectives in Malaria Diagnosis* (WHO/MAL/2000.1091) com recomendações para utilização de testes rápidos no diagnóstico de malária, onde propunham que os testes deveriam ter em torno de 95% de sensibilidade em relação à gota espessa e deveriam detectar pelo menos 100 parasitos/μl. A determinação quantitativa de parasitos viáveis e a diferenciação de seus produtos seriam essenciais para acompanhamento de terapêutica e avaliação do tratamento com drogas antimaláricas (OMS, 2000).

Diferentes sondas genéticas e marcadores de sondas foram estudados no diagnóstico da malária. Em geral, a PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de vantagens no diagnóstico de malária mista (Machado et al., 1998, Zaqueri et al., 2002, Kanunfre, 2003). A sua utilização tem sido indicada, em áreas endêmicas, para a detecção de assintomáticos e triagem de doadores de sangue (Speers et al., 2003, Kitchen e Chiodini, 2006). A detecção de menos de 5 parasitos/ μ l e a identificação das espécies faz da técnica excelente quando comparada com os níveis de sensibilidade e especificidade de outras técnicas não microscópicas para pesquisa de antígeno, podendo ser mais sensível que a gota espessa (Moody, 2002).

Farcas et al (2004) avaliaram a PCR em tempo real, obtendo uma sensibilidade de 99,5% e especificidade de 100%, mostrando-se mais rápida e menos suscetível a contaminação que a PCR convencional. Perandin et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes quando compararam as duas técnicas de PCR, em amostras de indivíduos que haviam visitado áreas endêmicas e apresentavam sintomas de malária. Porém, a PCR em tempo real não foi capaz de detectar *P. malariae* devido às seqüências variadas de RNA.

A aplicação dos testes que pesquisam anticorpos anti-*Plasmodium* depende do antígeno empregado. Em geral, os testes baseados na pesquisa de anticorpos contra as formas eritrocitárias são úteis em áreas endêmicas, para medir o grau de endemicidade da doença; verificar a presença ou

ausência de infecções pelos parasitos da malária; delinear as zonas com transmissão; detectar as mudanças sazonais de transmissão; investigar a reintrodução da malária em zonas com programas de controle; e avaliar as atividades de controle (FUNASA – Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998).

Nas zonas onde a malária não é endêmica, os métodos sorológicos são úteis para selecionar doadores de sangue; elucidar casos clínicos indefinidos; avaliar a terapêutica; diagnosticar casos febris com exames parasitológicos negativos; detectar malária em pessoas que regressam de zonas endêmicas; e detectar indivíduos com formas latentes da doença (FUNASA – Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998).

O antígeno de *P. falciparum* obtido de cultura em hemácias tem sido estudado e aplicado por vários autores, no teste ELISA, na detecção de anticorpos em diversos estudos soropidemiológicos e na triagem de doadores de sangue (Ávila et al., 1998).

Sutanto et al. (1992) aplicaram o teste ELISA anti-*P. falciparum* em diferentes áreas endêmicas na Indonésia e notaram diferenças significantes em áreas de alta, média e baixa endemicidade, concluindo que níveis de anticorpos eram proporcionais ao grau de exposição. Snow et al. (1996) avaliaram o risco de transmissão de malária em diferentes grupos de crianças, empregando a pesquisa de anticorpos IgM. Ferreira et al. (1998) pesquisaram subclasses de IgG em pacientes com malária complicada e não complicada em comunidades da Região Amazônica no Brasil, verificando que na malária complicada os níveis de IgG₁ estavam

diminuídos. Contreras et al. (1999) avaliaram os riscos de malária transfusional pesquisando anticorpos anti-*P. falciparum* em amostras de banco de sangue, na Venezuela. Perraut et al. (2002) compararam a reatividade do teste ELISA empregando extratos de diferentes cepas de *P. falciparum*, obtendo reatividade semelhante na pesquisa de anticorpos IgG em pool de soros reagentes.

Em áreas não-endêmicas os bancos de sangue não realizam a triagem sorológica para malária, limitando-se à aplicação de questionários. Entretanto, a pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* deve ser avaliada, especialmente porque o número de doadores em potencial que viaja para áreas endêmicas aumenta, ano a ano, em todo o mundo (Kitchen e Chiodini, 2006) e em muitos casos a eficácia do questionário de triagem utilizado pode ser questionada. Além disso, os testes sorológicos poderiam excluir casos de malária assintomáticos e autóctones de regiões consideradas não-endêmicas (Kitchen e Chiodini, 2006).

Entre os diferentes antígenos recombinantes que têm sido utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*, destaca-se a MSP1 (proteína 1 de superfície de merozoíto), com 180 a 230 kDa, que está presente em todas as espécies de *Plasmodium* (Holder, 1988; Hirunpetcharat et al., 1997). É uma das candidatas mais importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas eritrocitárias de *P. falciparum* e *P. vivax* (Good, 2005).

A MSP1 de *P. falciparum* (*PfMSP1*) tem 185kDa e é o precursor de várias proteínas importantes da superfície de merozoítos (Holder et al., 1987, Blackman et al., 1991a). É sintetizada durante a esquizogonia como uma proteína única presa à membrana plasmática do parasito por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Durante o desenvolvimento do merozoíto, a *PfMSP1* é clivada por proteases em quatro fragmentos principais, MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ e MSP1₄₂, que ficam presos, sob a forma de um complexo de polipeptídeos, na superfície do parasito, pelo fragmento de 42kDa ligado à porção GPI C-terminal (MSP1₄₂). Quando o merozoíto é liberado, o fragmento MSP1₄₂ ligado à membrana sofre uma clivagem proteolítica secundária (Blackman et al., 1991a, Miller et al., 1993). O produto de clivagem MSP1₃₃ da região da NH₂ terminal é solúvel, sendo liberado junto com o restante do complexo (Blackman e Holder, 1993), enquanto o fragmento MSP1₁₉ da região COOH terminal permanece na superfície do merozoíto durante a invasão e é carregado para a nova hemácia invadida (Blackman et al., 1990, 1991a, Blackman, 1994).

Anticorpos monoclonais que impedem a invasão ligam-se à *PfMSP1* na região C-terminal (Chappel e Holder, 1993). Como a ligação desses anticorpos também inibe a clivagem secundária do *PfMSP1*, foi proposto que essa seja a base do seu mecanismo protetor (Blackman et al., 1994). Estudos *in vitro* indicaram que a destruição eficiente do parasito envolve IgG₁ e IgG₃, mas não IgG₂ que normalmente é não-citofílico (Chumpitazi et al., 1996).

Nwuba et al., 2002 apresentaram evidências que a infecção natural por *P. falciparum* induz anticorpos inibidores da clivagem secundária de PfMSP1 e anticorpos bloqueadores que podem abolir esses efeitos protetores (Holder et al., 1999), fornecendo um meio eficiente para evasão da resposta imune do hospedeiro pelo parasito. O efeito dos anticorpos bloqueadores pode explicar a ausência de associação entre níveis de MSP1₁₉ e proteção clínica (Dodoo et al., 1999), embora alguns autores tenham encontrado associação entre anticorpos anti-MSP1₁₉ e proteção contra malária (Riley et al., 1992; Branch et al., 1998; Okech et al., 2004).

Os merozoítos de *Plasmodium vivax* expressam uma proteína de superfície equivalente à PfMSP1, conhecida como PvMSP1 (Del Portillo et al., 1991). Porém, em comparação com PfMSP1, há um menor número de estudos a respeito do processamento, destino dos fragmentos e resposta imune protetora da PvMSP1, o mesmo ocorrendo com a sua imunogenicidade (Sachdeva et al, 2004). Foi proposto que o seu mecanismo de processamento é semelhante ao do PfMSP1 (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001).

A partir da determinação da estrutura primária do gene que codifica a PvMSP1, várias proteínas recombinantes, baseadas nas seqüências que codificam as regiões N ou C-terminais da molécula, foram expressas em diferentes vetores (Cunha et al., 2002, Soares e Rodrigues, 2002, Sachdeva et al. 2004).

Estudos sobre a resposta imune naturalmente adquirida contra a PvMSP1 foram realizados em áreas endêmicas de malária, no Brasil (Soares et al., 1997, Soares et al., 1999a, 1999b, Morais et al., 2005, Nogueira et al., 2006), Colômbia (Espinosa et al., 2003) e na Coréia do Sul (Park et al., 2001, Kim et al., 2003). Esses estudos demonstraram que a região C-terminal (MSP1₁₉) é a mais imunogênica da molécula e que os anticorpos específicos estão associados com episódios recentes de malária.

Rodrigues et al. (2003) demonstraram que a pesquisa de anticorpos usando a proteína recombinante derivada da região C-terminal (19 kDa) PvMSP1 pela técnica de ELISA apresentou 90,9% de sensibilidade em amostras de indivíduos com gota positiva para *P. vivax*, que estavam tendo malária pela primeira vez.

Testes imunoenzimáticos empregando antígenos nativos e recombinantes podem ser sensíveis e específicos na detecção de anticorpos circulantes, porém nem sempre se correlacionam com a presença de parasitemia, pois podem ser negativos nos primeiros dias de infecção e continuar positivos por vários meses após o clareamento da parasitemia (Slinger et al., 2001, Kitchen e Chiodini, 2006).

7. DOT-ELISA

O teste dot-ELISA ou imuno-dot foi desenvolvido por Hawkes et al. (1982), que obtiveram excelentes resultados com proteínas solúveis, ácidos nucléicos, membranas, organelas, fungos, protozoários, bactérias e vírus. Utiliza membranas de nitrocelulose e permite a realização de um grande número de ensaios com pequenas quantidades de antígeno (Kurstak, 1986).

O Dot-ELISA foi utilizado para a pesquisa de antígenos e anticorpos em várias doenças infecciosas e em amostras de doadores de banco de sangue. Londner et al. (1988) verificaram que o Dot-ELISA foi mais sensível que a imunofluorescência e menos que o radioimunoensaio para pesquisa anticorpos anti-*P. falciparum*, sendo indicado para estudos epidemiológicos. Oprandy e Long (1990) empregaram o Dot-ELISA na detecção de esporozoítos de com uma sensibilidade de 10 esporozoítos por *pool* de 1 a 10 mosquitos. Na Venezuela, Contreras et al. (1999) testaram a presença de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* em amostras de doadores de sangue de áreas endêmicas e não-endêmicas de malária e observaram uma correlação entre os resultados de ELISA-IgG e Dot-ELISA-IgG. Anand et al. (2001) desenvolveram um Dot-ELISA para a pesquisa de rotavirus nas fezes, recomendando o teste como uma alternativa para a detecção dos vírus em amostras de campo. Eamsobhana et al. (2004) empregaram uma glicoproteína de 31-kDa electroeluída de vermes adultos de *Parastrongylus cantonensis* para o diagnóstico da parastrongilíase humana, obtendo 100%

de sensibilidade e especificidade. Rai et al. (2004) desenvolveram um Dot-ELISA em sanduíche para a detecção direta do antígeno de *Streptococcus pneumoniae* no líquido, mostrando-se mais sensível que a aglutinação do látex. Sato et al. (2004) avaliaram três antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* cepa Nichols para o diagnóstico de sífilis, obtendo 95,1% de sensibilidade e 94,7% de especificidade. Siavashi et al. (2005) compararam Dot-ELISA e ELISA de sanduíche na detecção da hidatidose humana empregando como antígeno líquido hidático, obtendo 100% de sensibilidade no Dot-ELISA. Courtioux et al. (2005) utilizaram o Dot-ELISA na verificação do envolvimento do sistema nervoso central na tripanossomíase africana através da detecção de anticorpos específicos no líquido, recomendando o teste em laboratórios pouco equipados ou no campo e para melhorar o tratamento do paciente.

8. TESTES MULTIPARAMÉTRICOS

Os testes sorológicos clássicos geralmente permitem a medida de antígenos ou anticorpos individualmente. Porém, há circunstâncias em que é desejável medir mais de uma substância em uma amostra biológica e essa necessidade tende a aumentar com a heterogeneidade molecular e a complexidade dos sistemas biológicos (Ekins et al., 1990).

Um importante desafio desde a década passada tem sido o desenvolvimento de ensaios multiparamétricos (*multianalyte*, *multiplexed* ou *multiplexing*), que possibilitem a detecção de anticorpos, antígenos, hormônios, drogas etc. diferentes, simultaneamente em um mesmo ensaio e que possam ser implementados na rotina laboratorial (Kakabakos et al., 1992; Kricka, 1992). Como consequência, tem havido um grande empenho dos pesquisadores na implementação de ensaios multiparamétricos automatizados, empregando as mais diversas tecnologias. Prova disso é o grande número de publicações relativas a esse assunto. Entre elas, os ensaios que empregam um citômetro de fluxo acoplado a um computador, utilizando micro esferas com diferentes conjuntos de cores de fluorescência, têm sido aplicados aos mais variados tipos de painéis, com resultados promissores (Fulton, et al., 1997; Gordon e McDade, 1997; McDade e Fulton, 1997; Oliver, 1998; Smith et al., 1998).

O termo inglês *multiplexing* foi introduzido no Dicionário Oxford, sendo definido como “a transmissão simultânea de várias mensagens por um mesmo canal de comunicação” (Price, 2001).

O desenvolvimento de ensaios, capazes de detectar, simultaneamente, anticorpos com diferentes especificidades, tem um potencial muito elevado para aplicação em estudos epidemiológicos, desenvolvimento de vacinas, bem como no diagnóstico de alergias, doenças auto-imunes, infecciosas e parasitárias, entre outras (Mezzasoma et al., 2002), resultando em economia de tempo, reagente e amostra com

conseqüente redução dos custos. Além disso, reduzem a possibilidade de erro devida à troca de amostras, pois não há necessidade de alíquotá-las para efetuar os testes separadamente (Oliver et al., 1998).

Os primeiros estudos empregaram ensaios multiparamétricos tendo como princípio a combinação de dois, três ou quatro imunoenaios diferentes no mesmo sistema de reação, marcando o reagente de detecção de cada sistema com um marcador diferente. Têm sido desenvolvidos ensaios empregando marcadores radioativos, enzimáticos, quimioluminescentes e fluorescentes (Ekins et al., 1990).

Uma alternativa tem sido separar as reações individuais em regiões diferentes da fase sólida, permitindo a utilização do mesmo marcador (Kricka, 1994). Uma estratégia foi formar um arranjo de discretas zonas reativas como no teste de alergia que contém 35 linhas, cada uma com um alérgeno diferente (Brown et al., 1985). Áreas de reação separadas também podem ser conseguidas imobilizando diferentes antígenos em membranas adequadas mediante as técnicas de *dot*, atração ou ligação química (Pappas, 1988).

As membranas de nitrocelulose absorvem proteínas com grande eficiência (praticamente 100%), sendo muito úteis, como fase sólida, em ensaios qualitativos, quando o volume da amostra é muito pequeno ou com antígenos solubilizados em detergentes iônicos (Kurstak, 1986).

Vários estudos têm empregado a membrana de nitrocelulose como fase sólida nos ensaios multiparamétricos. Donohue et al. (1989) desenvolveram um método de ensaio multiparamétrico que utiliza a nitrocelulose sensibilizada com diferentes antígenos de agentes infecciosos.

No sistema descrito por Noya e Alarcon de Noya (1998), que foi denominado “Multiple Antigen Blot Assay” (MABA), 28 diferentes antígenos de *Schistosoma mansoni* e *Plasmodium falciparum* foram imobilizados em membrana de nitrocelulose em linhas paralelas delimitadas pelo molde de um aparelho dotador. As tiras foram cortadas perpendicularmente às linhas dos antígenos e imersas individualmente em soros, adicionadas ao conjugado de peroxidase e depois a um substrato quimioluminescente. Quando comparado ao ELISA convencional para *S. mansoni*, o MABA demonstrou ser duas vezes mais sensível. Os autores recomendam seu uso na triagem de uma grande variedade de antígenos circulantes ou anticorpos contra agentes infecciosos em centros de saúde e bancos de sangue para pesquisa de HIV, Chagas, Hepatite, Sífilis, etc.

A comparação da reatividade de uma amostra frente a diferentes antígenos é mais confiável em um ensaio Dot-ELISA multiparamétrico, pois todos estão na mesma tira e sob as mesmas condições (Noya e Alarcon de Noya, 1998).

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a padronização e desenvolvimento de técnicas que se prestem à realização de vários ensaios em uma única amostra e ao mesmo tempo têm sido o grande desafio dos métodos para diagnóstico. Todo esse esforço visando principalmente à redução dos custos, diminuição do tempo de reação, obtenção de resultados mais confiáveis e aumento da produtividade dos laboratórios.

A técnica de Dot-ELISA foi escolhida para a padronização do ensaio multiparamétrico, devido à sua versatilidade, economia de reagentes e sensibilidade. A capacidade de absorver quase 100% das proteínas aplicadas na membrana de nitrocelulose facilita a padronização da quantidade de antígeno necessária para cada sistema do ensaio multiparamétrico.

A análise simultânea de amostras para a pesquisa de anticorpos anti-*P. vivax*, anti-*P. falciparum*, anti-*T. pallidum* e anti-*T. cruzi* têm grande importância devido ao risco em comum de transmissão pelo sangue contaminado e via congênita e pela sobreposição das áreas de incidência das infecções adquiridas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o método Dot-ELISA multiparamétrico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, anti-*T. pallidum*, anti-*P. vivax* e anti-*P. falciparum*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o Dot-ELISA individualmente para malária, doença de Chagas e sífilis.
- b) Padronizar o Dot-ELISA multiparamétrico (Dot-ELISA-Multi) para malária, doença de Chagas e sífilis.
- c) Avaliar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do ensaio padronizado.

CASUÍSTICA E MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA E MATERIAIS E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Neste estudo foram utilizadas amostras de soro de indivíduos com as seguintes características clínicas:

a) 40 amostras de soros padrão, sendo 10 amostras negativas para anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, *T. pallidum*, *P. vivax* e *P. falciparum*, 10 amostras positivas para anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, 10 anti-*T. pallidum* e 10 anti-*P. vivax* e *P. falciparum*.

b) 52 amostras de soros de pacientes com doença de Chagas crônica, residentes em área endêmica (Montes Claros, MG). O diagnóstico inicial foi confirmado clínica e sorologicamente por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e hemaglutinação com antígeno de formas epimastigotas de *T. cruzi* e por *Western blotting* com TESA (*Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen*).

c) 43 amostras de soro de pacientes com sífilis, em diferentes estágios clínicos da doença: 12 na fase latente recente (LR), 19 na fase latente tardia

(LT), 2 com sífilis primária (SP), 7 com sífilis secundária (SS) e 3 com sífilis terciária (ST). O diagnóstico inicial foi confirmado clínica e sorologicamente por testes treponêmicos (FTA-Abs, hemaglutinação e *Western blotting*) e não-treponêmico (VDRL).

d) 103 amostras de indivíduos, dos quais se tinha: o histórico em relação ao número de malárias, tempo decorrido desde o último episódio de malária, espécie de plasmódio da última malária, o resultado da análise microscópica da gota espessa corada por Giemsa e dos testes ELISA *Pf-Zw* e imunofluorescência indireta com antígenos de *P. vivax* e *P. falciparum* para a pesquisa de anticorpos IgG. Destas, 79 amostras eram de moradores em região endêmica para malária e 24 eram de pacientes atendidos na SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP. De acordo com o resultado da gota espessa, as amostras foram divididas em três subgrupos, cujas características parasitológicas e epidemiológicas estão descritas na **tabela 1**.

d.1. Gota espessa positiva para *P. vivax** – 41 amostras de pacientes, sendo que 20 tinham malária pela primeira vez (Belém, PA – 19, Ariquemes, RO – 1) e 21 haviam tido episódios anteriores de malária, causados por *P.falciparum* ou *P. vivax* (Belém, PA – 11, Alta Floresta, MT – 5, Colíder, MT – 3, Igarapé-Açu, PA – 1, Conceição do Araguaia, PA – 1).

d.2. Gota espessa positiva para *P. falciparum** – 30 amostras de pacientes, sendo que 15 tinham malária pela primeira vez (Ariquemes, RO – 5, Alta Floresta, MT – 2, Colíder, MT – 1, Redenção, PA – 1, Manaus, AM – 1, Humaitá, AM – 1, Porto Velho, RO – 1, Amazônia Legal – 1, Nigéria – 1, Costa do Marfim – 1) e 15 haviam tido episódios anteriores de malária, causados por *P.falciparum* ou *P. vivax* (Alta Floresta, MT – 5, Colíder, MT – 4, Ariquemes, RO – 2, Porto Velho, RO – 1, Itaituba, PA – 1, São Félix do Xingu, PA – 1, Conceição do Araguaia, PA – 1).

* Seis amostras eram de pacientes com infecção mista por *P.falciparum* e *P. vivax*.e, portanto, foram consideradas em ambos os grupos, d.1 e d.2.

d.3. Gota espessa negativa – 38 amostras de indivíduos residentes em área endêmica para malária (Alta Floresta, MT) que relataram ter tido malária de 3 dias até 2 anos e meio antes da coleta, mas que não apresentavam parasitas detectáveis à observação microscópica, no momento da coleta das amostras.

e) 21 amostras de soros de pacientes com anticorpos heterólogos, sendo 7 com anticorpos para mononucleose infecciosa detectados por imunofluorescência indireta com o antígeno de capsídio viral do vírus Epstein-Barr, 7 positivas para fator reumatóide medido por nefelometria e 7

positivas para fator anti-núcleo detectado por imunofluorescência indireta com células HEp-2.

f) 100 de amostras de sangue de doadores saudáveis da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, SP, triados por ELISA para HIV-1 e 2, HTLV 1/2, HBV (anticorpo anti-HBV e antígeno HBV), HCV; por VDRL e ELISA para sífilis e por imunofluorescência indireta, hemaglutinação e ELISA para doença de Chagas. Esses eram os testes feitos no Banco de Sangue em outubro de 1999, época em que as bolsas de sangue foram coletadas.

g) 30 amostras de pacientes com leishmaniose, sendo com 18 da forma cutânea (LC) e 12 da mucocutânea (LMC). O diagnóstico inicial foi confirmado clínica e sorologicamente por teste de imunofluorescência indireta e ELISA com antígeno de formas promastigotas de *Leishmania major-like*.

Tabela 1. Características parasitológicas e epidemiológicas dos pacientes e residentes em área endêmica, estudados no grupo de área endêmica de malária.

Subgrupos de malária (n)	Procedência (n)	Malárias anteriores		
		Número ^a (mediana)	Tempo ^b (mediana)	Espécie ^c (%)
Gota espessa negativa (38)	MT (38)	1 a 60 (7)	3 dias a 2,5 anos (90 dias)	<i>P. falciparum</i> (26) <i>P. vivax</i> (58)
Gota espessa positiva (65)				
• [redacted] Primeiro episódio de malária (20)	PA (19) RO (1)	-	-	-
Episódios anteriores de malária (21)	PA (13) MT (8)	2 a 200 (2)	20 dias a 10 anos (255 dias)	<i>P. falciparum</i> (10) <i>P. vivax</i> (43)
• [redacted] Primeiro episódio de malária (15)	RO (6), MT (3) PA (1), AM (2), Amazônia Legal (1) Nigéria (1), Costa do Marfim (1)	-	-	-
Episódios anteriores de malária (15)	MT (9) RO (3) PA (3)	2 a 20 (9)	1 a 11 meses (225 dias)	<i>P. falciparum</i> (40) <i>P. vivax</i> (47)

^a Número de episódios de malárias anteriores

^b Tempo decorrido desde o último episódio de malária

^c Espécie de plasmódio do último episódio de malária

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Parte das amostras de soro utilizada no estudo estava estocada no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP e foi colhida, mediante consentimento informado do paciente, para realização de pesquisas afins. O laboratório Fleury cedeu excedente das amostras colhidas de pacientes da rotina, sendo que nenhuma amostra foi colhida especialmente para este estudo. O laboratório preserva a identidade desses pacientes, revelando apenas o resultado dos exames solicitados pelo médico. A SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), São Paulo, SP forneceu amostras de pacientes com atendidos no seu Ambulatório, que estavam com parasitemia no momento da coleta. Segundo parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP, nenhuma objeção deve ser feita à utilização de material biológico estocado, originalmente colhido no contexto de pesquisas afins com o atual projeto, desde que garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos e a conservação e utilização eticamente corretas do material, bem como das informações obtidas a partir dele. Todas as amostras de sangue que foram coletadas no presente projeto obedeceram aos critérios estabelecidos pela resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3. OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS PARA O DOT-ELISA

3.1. *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dois diferentes antígenos de *T.cruzi* foram empregados no Dot-ELISA-Multi: Extrato Alcalino de Epimastigota (EAE) e antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA). Os antígenos foram cedidos gentilmente pela Profa. Eufrosina S. Umezawa e produzidos no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.1.1. PREPARO DO ANTÍGENO EAE

As formas epimastigotas da cepa Y foram cultivadas em meio LIT (*liver infusion triptose serum medium*), preparado com infusão de fígado, triptose, soro bovino fetal, solução de hemoglobina, glicose e sais. Depois de

adicionar hemoglobina, toda a mistura foi filtrada e aquecida a 68°C por uma hora. Os epimastigotas obtidos da cultura foram lavados e incubados com NaOH 0,3 N e mantidos por 18 horas a 4°C e neutralizados (pH 7,4) com solução de HCl 0,3 N. Os resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação (Hoshino-Shimizu et al., 1978; Lissaldo et al., 1994; Umezawa et al., 1996b). A quantificação de proteínas foi feita usando o método Macro-BCA (*bicinchoninic acid*) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), conforme protocolo do fornecedor.

3.1.2. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO TESA

Para a obtenção do antígeno TESA, células LLC-MK₂ foram infectadas com 5×10^6 formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, incubadas durante quatro dias, lavadas duas vezes e re-incubadas por 18 a 20 horas, a 37°C em 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) contendo ou não 2% de soro fetal bovino. O sobrenadante obtido, contendo 10×10^6 formas tripomastigotas por mL, foi centrifugado a 2.800 x g por 10 minutos a 4°C, filtrado em membrana de acetato celulose (0,20 µm) e estocado a -70°C (Umezawa et al., 1996a, 2001). A dosagem de proteínas no antígeno TESA sem soro fetal bovino foi feita usando o método Micro-BCA (*bicinchoninic acid*) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), conforme protocolo do fornecedor.

3.2. *TREPONEMA PALLIDUM*

O extrato antigênico de *T. pallidum* foi cedido gentilmente por Elaine Antunes de Lemos e produzido no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.2.1. PREPARO DO ANTÍGENO (*TP-ZW*)

A extração do antígeno *Tp-Zw* foi realizada de acordo com procedimento descrito (Lemos, 2002; Alderete et al., 1985). A cepa Nichols de *T.pallidum* foi mantida por passagens seriadas em testículos de coelhos que receberam em cada testículo 1,0 mL de suspensão de treponemas, com boa mobilidade e sem contaminação bacteriana. Após inoculação cada animal recebeu uma dose intramuscular de 0,2 mL do imunossupressor Depo®medrol (The Upjohn Co. Michigan, EUA). Após 10 dias de inoculação, os animais foram sacrificados e os testículos retirados em condições assépticas, lavados com solução fisiológica estéril, transferidos para frascos de vidro e cortados em pedaços menores. A retirada do treponema foi realizada a 37°C, com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfatos, 0,01 M, pH 7,2) estéril, contendo 10% de soro normal de coelho onde foi observada em microscopia de campo escuro a quantidade de treponemas viáveis. Testículos com rendimento inferior a 80 treponemas por

campo (400x) foram descartados. As soluções utilizadas foram centrifugadas a 2.300 x g, por 10 minutos, a 4°C, para retirada de restos celulares. Parte da suspensão de treponemas foi utilizada na inoculação de novos coelhos e o restante centrifugado a 8.200 x g por 30 minutos a 4°C, lavado duas vezes com PBS e o sedimento final armazenado em freezer -70°C até o uso. O extrato antigênico de *T.pallidum* foi obtido através da extração com Zwittergent® (Calbiochem Co, La Jolla, CA, USA). Os sedimentos dos treponemas, provenientes de um total de 8 coelhos infectados, foram ressuspensos em 5 mL de PBS contendo 1mM do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (*phenylmethyl sulfonyl fluoride* – PMSF) (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Após homogeneização, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 1 mL de PBS contendo 1 mM de PMSF acrescido de 0,97 µL de Zwittergent® a 10% em PBS. Adicionou-se 1,7 mL de PSF contendo 1mL de PMSF e centrifugou-se a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4° C. O processo de extração foi repetido por mais duas vezes sendo o sobrenadante dialisado em membrana benzoilatada (D-7884, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA) por 24 horas, com três trocas de PBS. Para a dosagem das proteínas utilizou-se o método *Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), fundamentado na metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

3.3. PLASMODIUM FALCIPARUM E PLASMODIUM VIVAX

Para a pesquisa de anticorpos para malária, foram empregados antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax*.

3.3.1. MANUTENÇÃO DE *P. FALCIPARUM*

A cepa ADA, isolada no estado de Rondônia de um paciente cujo nome é Adalberto, em 1982, de *P. falciparum* é mantida no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical por cultivo *in vitro* (Trager e Jensen, 1976) e por congelamento em Nitrogênio (N₂) líquido.

Os eritrócitos infectados por *P. falciparum* foram descongelados em banho-maria a 37° C, por 2 minutos, e colocadas em tubo estéril. Para cada 1 mL de células congeladas, adicionou-se 0,2 mL de NaCl 12%, sob agitação. Após 5 minutos em repouso, adicionaram-se 10 mL de NaCl 1,6% com uma agulha de 21 G (1 a 2 gotas/ segundo). O material foi centrifugado a 1.500 x *g* por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensão com 10 mL de NaCl 0,9% e dextrose 0,2%. Após nova centrifugação, o sedimento de eritrócitos foi adicionado ao meio de cultura, para recuperação dos parasitos.

Os parasitos foram cultivados assincronicamente em hemácias humanas do grupo O, Rh positivo, em placas de Petri contendo 8 mL de meio RPMI 1640 suplementado com glicose, hipoxantina, bicarbonato de sódio, tampão HEPES, gentamicina e soro humana A, Rh positivo. Após acertar-se o hematócrito para 4%, as placas foram incubadas a 37°C, em dessecadores com tensão de 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados diariamente. Quando a parasitemia alcançou um mínimo de 4%, ou a cada três dias, foi feito o repique para duas novas placas de Petri.

Quando a parasitemia atingiu níveis acima de 10%, com predominância de formas em anel, os eritrócitos de cultivo foram centrifugados e para cada 1 mL de sedimento adicionou-se 0,34 mL de *glycerolyte* na velocidade de uma gota/ segundo, sob leve agitação. Após 5 minutos em repouso, adicionou-se mais 1,36 mL de *glycerolyte*, nas mesmas condições anteriores. O produto final foi dividido em alíquotas de 1 mL em ampolas de congelamento e, após 18 horas a -80° C, foi armazenado em botijão com N₂ líquido.

3.3.2. PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO SOMÁTICO DE *P. FALCIPARUM* (PF-ZW)

Quando a parasitemia alcançou no mínimo 10%, com predominância de esquizontes, as culturas foram centrifugadas a 1.500 x g, por 10 minutos,

para a separação das hemácias. Após lavagens por duas vezes com PBS, as hemácias foram lisadas pela adição de saponina (Merck, Darmstadt, FR, Germany) a 0,04% em PBS (Hall et al., 1983). Após homogeneizar e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a $3.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos, para separação dos plasmódios. Após lavagens por três vezes com PBS, o sedimento foi processado imediatamente para extração dos componentes antigênicos.

Antígenos somáticos foram extraídos com detergente anfótero Zwittergent[®] a 2% em PBS contendo os seguintes inibidores de proteases: aprotinina ($50 \mu\text{g/mL}$), leupeptina ($1 \mu\text{g/mL}$), antipaína ($1 \mu\text{g/mL}$) e PMSF (1 mM).

Aproximadamente, 100 mg (peso úmido) de sedimento de parasitos foram ressuspensos na solução de Zwittergent[®] a 2% em PBS com os inibidores de proteases e submetidos a uma homogeneização com pipeta Pasteur até total dissolução, observada visualmente. Em seguida, centrifugou-se por 30 minutos, a $14.000 \times g$, 4°C . O conteúdo protéico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e o antígeno aliqotado e estocado em N_2 líquido.

3.3.3. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE *P. VIVAX* (PvMSP1₁₉)

A proteína recombinante derivada da região C-terminal (19 kDa) da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto de *P. vivax* (MSP1₁₉) foi expressa em *Escherichia coli* a partir do vetor de expressão pET-14b em fusão com cauda de histidina (His₆-MSP1₁₉) (Cunha et al., 2001; Rodrigues et al., 2003). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

O antígeno recombinante de MSP-1₁₉ de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Irene da Silva Soares do Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4. TESTES UTILIZADOS COMO REFERÊNCIA

Para malária, foram empregados testes ELISA com os mesmos antígenos utilizados na técnica Dot-ELISA. As amostras de doença de Chagas foram ensaiadas pelo *Western Blotting* com antígeno TESA (TESA-Blot). Para sífilis, utilizou-se o teste de imunofluorescência indireta (FTA-Abs, Wama Diagnóstica, São Carlos, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

4.1. ANTICORPOS ANTI-*T. CRUZI*

4.1.1. TESA-BLOT

Foi utilizado o teste de referência TESA-Blot (Umezawa, et al., 1996a). O kit para realização do TESA-Blot foi produzido no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sendo cedido gentilmente por Elaine Antunes de Lemos, tendo sido realizado de acordo com o procedimento padronizado.

Fitas de nitrocelulose contendo antígeno TESA (antígenos de secreção e excreção obtidos pelo cultivo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*) foram preparadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose. Inicialmente, as tiras foram incubadas por 1 minuto, sob agitação, com 1 mL de tampão TRIS 10 mM (pH 7,4) contendo NaCl 154 mM (TRIS-NaCl) e proteínas do leite. Após o umedecimento das fitas, acrescentou-se 10 µL de soro puro ou 20 µL de soro glicerinado (diluição 1/100) e incubou-se por 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação. Após incubação, as tiras foram lavadas 5 vezes por 5 minutos, sob agitação, com tampão TRIS-NaCl. Em seguida, adicionou-se 1mL de conjugado anti-IgG humana-peroxidase e incubou-se por 1 hora, nas condições anteriores. Após novo ciclo de lavagens, adicionou-se 1 mL de

solução cromógena (4-cloro- α -naftol 0,56 mM em tampão TRIS-NaCl contendo 0,025% de H₂O₂), incubou-se por 10 minutos, como anteriormente e procedeu-se a duas lavagens rápidas com H₂O destilada, para interromper o desenvolvimento de cor. Após a secagem das tiras, a positividade do teste foi verificada visualmente pela presença de bandas na região de massa molecular de 120 a 200 kDa. A presença de bandas fora dessa região foi considerada reação negativa.

4.1.2. ANTICORPOS ANTI-*T. PALLIDUM*

4.1.2.1. FTA-ABS (“FLUORESCENT TREPONEMAL ANTIBODY ABSORPTION”)

Para a determinação de anticorpos anti-*Treponema pallidum* nas amostras de soro foi utilizado um Kit comercial (WAMA Diagnóstica, São Carlos, SP, Brasil), conforme instruções do fabricante. Os soros foram inativados por 30 minutos, a 56°C, diluídos 1/5 em solução absorvente (*Treponema* cepa Reiter) e deixadas em repouso por 15 minutos. Após as lâminas sensibilizadas atingirem a temperatura ambiente, uma gota de cada controle e das amostras diluídas foi adicionada nas áreas reativas das lâminas, que foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após três lavagens por cinco minutos com PBS, foi

adicionada uma gota do conjugado anti-IgG humana-isotiociano de fluoresceína, incubaram-se as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente, protegendo da luz e, em seguida, procedeu-se a outro ciclo de lavagens. As áreas reativas da lâmina foram cobertas com glicerina tamponada e lamínula e observadas em microscópio de imunofluorescência. De acordo com a intensidade de fluorescência, os resultados foram classificados de + (intensidade fraca) a ++++ (intensidade forte).

4.1.3. ANTICORPOS ANTI-*P. FALCIPARUM* E ANTI-*P. VIVAX*

4.1.3.1. TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM *PF-ZW*

Foi utilizada a técnica descrita por Sanchez et al. (1993). Placas Nunc *polysorp* de fundo plano foram sensibilizadas com 100 µL do extrato antigênico de *Plasmodium falciparum* a 5 µg/mL e incubadas por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBS 0,01 M (pH 7,2) com Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 200 µL de leite desnatado a 5% em PBS-T (PBS-TL-5%) e incubadas por mais 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após novo ciclo de lavagens, foram adicionadas 100 µL das amostras de soro diluídas a 1/100 em leite desnatado a 2% em PBS-T (PBS-TL-2%) às cavidades, em duplicata, com

incubação de 40 minutos a 37⁰C em câmara úmida. Após lavagem, 100 µL do conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase, diluído em PBS-TL-2%, foi adicionado e incubou-se por 40 minutos a 37⁰C em câmara úmida. Outro ciclo de lavagem foi realizado adicionando-se em seguida a solução cromógena (100 µL/cavidade): 5 mg de ortofenilenodiamina (OPD) e 5 µL de H₂O₂ 30% em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0), por 30 minutos a 37⁰C, em local protegido da luz. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N (50 µL/cavidade). A leitura da reação foi feita medindo a absorbância em leitora de placas de ELISA (Titertek Multiskan MCC340) com filtro de 492 nm. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR igual ou superior a 1.

4.1.3.2. TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM PvMSP1₁₉

Foi utilizada a técnica descrita por Rodrigues et al., 2003 com algumas modificações baseadas no trabalho de Kudó et al., 2005. Placas de poliestireno Costar 3590, *High Binding*, foram sensibilizadas com 4 µg/mL do antígeno MSP-1₁₉ (50 µL/ cavidade) diluído em tampão carbonato 0,05M (pH 9,6), por 2 horas a 37⁰C e “overnight” a 4⁰C. Após uma lavagem com PBS-T, as placas foram bloqueadas com 200 µL PBS-TL-5% e incubadas por 2

horas a 37⁰C em câmara úmida. Após três lavagens, foram adicionadas 50 µL das amostras de soro diluídas a 1/100 em PBS-TL-5% às cavidades, em duplicata, com incubação de 30 minutos a 37⁰C em câmara úmida. Após lavagem, 50 µL do conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase (Sigma 0170) diluído a 1/20.000 em PBS-TL-5% foi adicionado e incubou-se por 30 minutos a 37⁰C em câmara úmida. Após outro ciclo de lavagem, adicionou-se a solução cromógena (100 µL/cavidade): OPD a 1 mg/mL em tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0) e 5 µL de H₂O₂ 30%, por 30 minutos a 37⁰C, em local protegido da luz. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N (50 µL/cavidade). A leitura da reação foi feita medindo a densidade óptica em leitora de ELISA (Titertek Multiskan MCC340) com filtro de 492 nm. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR ≥ 1.

4.2. PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA

A padronização do Dot-ELISA foi baseada na técnica descrita por Pappas, 1998, com as modificações que se mostraram necessárias. O Dot-ELISA foi padronizado separadamente para cada um dos 5 antígenos estudados.

Nesta etapa de padronização, utilizaram-se 40 soros padrão e soros de painel. O painel negativo constitui-se de 100 amostras de Banco de Sangue e o painel positivo foi composto por 48 amostras para o teste com *Tp-Zw*, 52 com TESA; 16 com EAE; 24 com *Pf-Zw* e 29 com *PvMSP1*₁₉. Essas amostras fazem parte da casuística descrita no item 4.1.

Para selecionar os antígenos que forneciam os melhores resultados, inicialmente, testaram-se dois extratos de *Pf-Zw*, três extratos de *Tp-Zw* e sete lotes de TESA, sendo dois produzidos a partir de culturas de células em RPMI sem soro fetal bovino e cinco de culturas em meio RPMI com soro fetal bovino. Também, se testaram dois conjugados anti-IgG-peroxidase da Sigma (A6029 e A0170) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA).

Definidos os antígenos e conjugado a serem empregados, foram avaliadas as seguintes condições de reação: concentração de antígeno, diluição das amostras, diluição do conjugado, diluente de amostra e conjugado; tempo de incubação.

As **tabelas 2 e 3** mostram as condições estudadas.

Tabela 2. Resumo das variáveis estudadas na padronização do Dot-ELISA.

Antígeno	Diluição do antígeno µg/mL	Diluição do soro	Diluição do conjugado anti-igG-peroxidase
<i>Pf-Zw</i>	26 – 52 – 104 – 207	1/50	1/200
	415 – 830 – 1660	1/100	1/250
			1/500
<i>PvMSP1₁₉</i>	3 – 5 – 11 – 22 – 43	1/100	1/200
	87 – 175 – 350 - 700		1/500
EAE	4 – 8 – 16 – 33 – 66	1/50	1/200
	133 – 268 – 535 - 1070	1/100	1/250
			1/500
TESA	20 – 40	1/50	1/200
		1/100	1/250
			1/500
<i>Tp-Zw</i>	6 – 12 – 25 – 50 – 100	1/50	1/200
	200– 400 - 800	1/100	1/250
			1/500

Tabela 3. Resumo das condições estudadas na padronização do Dot-ELISA.

Condições	Tempo incubação (horas)	Diluyente	Lavagens após
Sensibilização (antígeno)	–	Carbonato-bicarbonato ^a PBS H ₂ O miliQ	–
Bloqueio	0,5 1 2	PBS-TL 5%	H ₂ O miliQ – 10 x (2 min)
Soro	0,5 1 2	PBS PBS-T ^b PBS-L 5% ^c PBS-TL 1%, 2%, 3%, 5%	H ₂ O Miliq – 3 x (2 min) PBS-T – 2 x (2 min) + H ₂ O Miliq – 1 x (2 min)
Conjugado	0,5 1 2	PBS PBS-T PBS-L 5% PBS-TL 1%, 2%, 3%, 5%	H ₂ O Miliq – 3 x (2 min) PBS-T – 2 x (2 min) + H ₂ O Miliq – 1 x (2 min)
Substrato	0,5 1	Protocolo da Sigma	H ₂ O MILIQ - 3 x (2 min)

^a Tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6

^b PBS 0,001 M, pH 7,2 com 0,05% de Tween 20

^c PBS-T com 5% de leite desnatado

4.3. PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA-MULTI

Para a padronização do Dot-Elisa-Multi utilizaram-se as condições de reação que forneceram os melhores resultados de sensibilidade e especificidade nos ensaios com os antígenos testados separadamente, frente a padrões positivos e negativos e amostras de painel, no Dot-ELISA. Além disso, levou-se em consideração tempo de incubação menor e facilidade na leitura visual da reação.

A seguir descrevem-se as condições de reação que forneceram os melhores resultados no Dot-ELISA-Multi.

a) Utilizaram-se membranas de nitrocelulose (0,2 μm ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) cortadas em tiras de 4 x 30 μm , que foram dotadas com 1 μL de cada antígeno nas concentrações de 104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Pf-Zw*); 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*PvMSP1₁₉*); 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EAE); 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TESA) e 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*Tp-Zw*). Após a sensibilização as tiras ficaram por 1 hora à temperatura ambiente.

b) As tiras foram bloqueadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado (PBS-TM), por 1 hora à temperatura ambiente, com agitação, sendo lavadas 10 vezes (2 minutos cada) em água destilada, com agitação. Posteriormente as fitas ficaram secando por 1 hora à temperatura ambiente e foram estocadas a 4°C.

c) Adicionou-se 0,6 mL das amostras, diluídas a 1/100 em PBS-TM, nas cavidades do suporte de reação contendo as membranas e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente, com agitação. Após, as tiras foram lavadas 3 vezes (2 minutos cada), como anteriormente.

d) Adicionou-se 0,6 mL do conjugado anti-IgG humana-peroxidase (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), diluído a 1/500 em cada cavidade. Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente e procedeu-se a outro ciclo de lavagens como no item anterior.

e) Foi preparada uma solução mãe do substrato contendo 30 mg de 4-cloro- α -naftol (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) em 10 mL de metanol absoluto e estocada a 4°C. Para a revelação, adicionou-se 0,6 mL do substrato diluído (2 ml de solução mãe de substrato + 5 μ L de H₂O₂ 30% em 10 mL de PBS) em cada cavidade e incubou-se por 1 hora, procedendo-se a novo ciclo de lavagens.

A **figura 1** apresenta um modelo de tiras de nitrocelulose dotadas com os antígenos empregados no Dot-ELISA-Multi. O desenvolvimento de coloração azul nas áreas de reação corresponde a teste positivo, enquanto que ausência de coloração indica teste negativo.

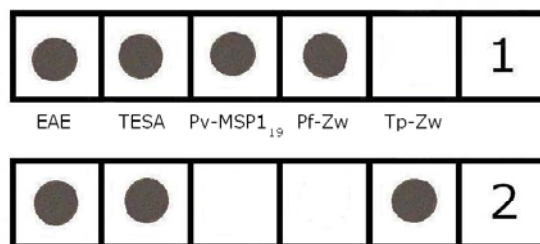


Figura 1. Representação esquemática das reações na membrana de nitrocelulose sensibilizadas com EAE e TESA de *T. cruzi*, PvMSP₁₁₉ de *P. vivax*, Pf-Zw de *P. falciparum* e Tp-Zw de *T. pallidum* do Dot-ELISA-Multi. A tira 1 mostra reações positivas para os antígenos EAE, TESA, Pv-MSP-1₁₉ e Pf-Zw. A tira 2 mostra reações positivas para EAE, TESA e Tp-Zw.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os programas Sigma Stat (Jandel Scientific) versão 1.0, WinEpiscope 1.0 e Microsoft Excel. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$).

A sensibilidade e especificidade dos testes foram calculadas usando a fórmula de Galen, 1980, sendo determinados intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%). A associação entre resultados e dados epidemiológicos foi avaliada pela correlação de Spearman. Para a comparação entre proporções empregaram-se os testes exato de Fisher ou χ^2 , conforme indicado. O grau de concordância entre os resultados do Dot-ELISA-Multi e dos testes de referência foi estimado pelo índice kappa (κ).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA

1.1. DOT-ELISA TESA

O conteúdo protéico dos lotes de TESA produzidos a partir de culturas sem soro fetal variou de 30 a 40 $\mu\text{g/mL}$.

Com os soros padrão positivos e negativos, o antígeno TESA, obtido em meio com soro fetal bovino, apresentou reação de mais fácil visualização quando utilizado puro.

A seguir, as condições que se mostraram mais adequadas no Dot-ELISA estão descritas:

- Amostras de soro diluídas 1/100 e incubadas 1 hora, à temperatura ambiente.
- Conjugado A6029 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) na diluição de 1/500 e 1 hora de incubação.

- Revelação com substrato 4-cloro- α -naftol (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) após 1 hora de incubação.

Nessas condições, a sensibilidade dos diferentes lotes variou entre 96% e 100%, em amostras de painel (**tabela 4**).

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) de diferentes lotes de antígeno TESA no Dot-ELISA, frente a soros positivos (N = 52) e negativos (N = 100).

Lote TESA	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)
Sem soro ^a		
278	96 (87 – 100)	99 (95 – 100)
279	98 (90 – 100)	99 (95 – 100)
Com soro ^b		
229	98 (90 – 100)	99 (95 – 100)
230	100 (93 – 100)	99 (95 – 100)
232	98 (90 – 100)	99 (95 – 100)
362	98 (90 – 100)	99 (95 – 100)
471	98 (90 – 100)	99 (95 – 100)

Antígeno TESA produzido a partir de culturas de células LLC-MK₂ infectadas com *T. cruzi*, sem soro fetal bovino (a) e com 2% de soro fetal bovino (b).

1.2. Dot-ELISA EAE

Nas condições descritas no item anterior, o antígeno EAE forneceu melhores resultados nas concentrações 66, 33 e 16 $\mu\text{g/mL}$, com os soros padrão positivos e negativos. Em amostras de painel, a sensibilidade foi de 100% nas três concentrações e a especificidade foi de 84%, 100% e 100%, respectivamente (**tabela 5**).

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno EAE no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 16) e negativos (N = 100).

EAE ($\mu\text{g/ml}$)	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)
66	100 (79 – 100)	84 (75 – 91)
33	100 (79 – 100)	100 (96 – 100)
16	100 (79 – 100)	100 (96 – 100)

1.3. Dot-ELISA TP-ZW

Em soros padrão positivos e negativos, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 800 (puro) e 400 $\mu\text{g/mL}$

de antígeno *Tp-Zw*, nas mesmas condições descritas no item 1.1. Em amostras de painel (48 positivas e 98 negativas), a sensibilidade foi mais elevada na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ e a especificidade na de 400 $\mu\text{g/mL}$ (**tabela 6**).

Tabela 6. Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno *Tp-Zw* no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 48) e negativos (N = 98).

<i>Tp-Zw</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)
800	94 (83 – 99)	95 (89 – 98)
400	90 (77 – 97)	98 (93 – 100)

1.4. Dot-ELISA *Pf-Zw*

A partir dos testes com os soros padrão positivos e negativos, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 104, 208 e 415 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno *Pf-Zw*, nas mesmas condições descritas no item 1.1. A **tabela 7** apresenta os resultados de sensibilidade e especificidade das quatro concentrações de antígeno selecionadas, testadas em amostras de painel, observando-se que índices

mais elevados (sensibilidade = 96% e especificidade = 100%) foram obtidos com 104 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno *Pf-Zw*.

Tabela 7. Sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) do antígeno *Pf-Zw* no Dot-ELISA, em diferentes concentrações frente a soros positivos (N = 24) e negativos (N = 100).

<i>Pf-Zw</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)
52	88 (68 – 97)	100 (96 – 100)
104	96 (79 – 100)	100 (96 – 100)
208	71 (49 – 87)	74 (64 – 82)
415	63 (41 – 81)	55 (45 – 65)

1.5. Dot-ELISA *PvMSP1₁₉*

A partir dos testes com soros padrão positivos e negativos, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 175, 350 e 700 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno *PvMSP1₁₉* nas mesmas condições descritas no item 1.1. Com 3, 5 e 11 $\mu\text{g/mL}$ os soros padrão positivos apresentaram resultados negativos, enquanto que com 22, 43 e 87 $\mu\text{g/mL}$, as amostras foram reagentes, embora a coloração do *dot* fosse bem menos intensa. Não houve diferença entre as concentrações de 175, 350 e 700 $\mu\text{g/mL}$, sendo

escolhida 175 µg/mL de antígeno, que com as amostras de painel (29 positivas e 100 negativas) forneceu 93% de sensibilidade e 100% de especificidade.

2. PADRONIZAÇÃO DO Dot-ELISA-MULTI

No capítulo de Casuística e Materiais e Métodos, no item 4.3 descrevem-se as condições de reação que forneceram os melhores resultados no teste multiparamétrico.

2.1. SENSIBILIDADE E POSITIVIDADE DO DOT-ELISA-MULTI

2.1.1. ANTICORPOS ANTI-*T. CRUZI*

A sensibilidade (CI 95%) do Dot-ELISA-Multi para os antígenos EAE e TESA foi de 100% (93%-100%) nas 52 amostras de pacientes com a forma crônica da doença de Chagas (**tabela 8**).

Entre as amostras de pacientes com sífilis, duas reagiram com TESA e EAE e uma com TESA. Essas três amostras também reagiram no teste de referência TESA-blot.

Das amostras de pacientes com malária, houve sete reagentes com os antígenos de *T. cruzi* (quatro com TESA e três com TESA e EAE), sendo seis dessas amostras confirmadas pelo TESA-blot. Entre os soros de indivíduos que relataram malárias anteriores, dois reagiram com TESA, um com EAE e um com ambos os antígenos, sendo duas dessas amostras confirmadas pelo TESA-blot.

2.1.2. ANTICORPOS ANTI-*T. PALLIDUM*

Nas 43 amostras de pacientes com sífilis, o Dot-ELISA-Multi apresentou 88% (79%-98%) de sensibilidade para o antígeno *Tp-Zw*; as cinco amostras não reagentes eram de pacientes com as formas latente tardia (2), primária (2) e terciária (1). Todas as amostras de pacientes com sífilis latente recente e secundária reagiram com o antígeno *Tp-Zw* (**tabela 8**).

Nas amostras de pacientes com malária, encontraram-se seis amostras reagentes para *Tp-Zw*, sendo quatro confirmadas pelo FTA-Abs.

Nenhuma das amostras de pacientes com doença de Chagas reagiu com o antígeno *Tp-Zw*.

2.1.3. ANTICORPOS ANTI-*P. VIVAX* E ANTI-*P. FALCIPARUM*

Nas 103 amostras de moradores em região endêmica para malária, o Dot-ELISA-Multi forneceu 81% (73%-88%) de positividade para *PvMSP1₁₉* e/ou *Pf-Zw*, sendo 70% (61%-79%) para *PvMSP1₁₉* e 30% (21%-39%) para *Pf-Zw* (**tabela 8**). Vinte e cinco amostras reagiram com ambos os antígenos e 20 não reagiram com nenhum dos antígenos. Nenhuma das amostras de pacientes com doença de Chagas ou sífilis reagiu com os antígenos para malária.

2.2. ESPECIFICIDADE DO DOT-ELISA-MULTI

A **tabela 8** apresenta os resultados de especificidade.

As 21 amostras de pacientes com anticorpos heterólogos estudadas no Dot-Elisa-Multi foram não-reagentes para os cinco antígenos empregados, obtendo-se uma especificidade de 100% (84%-100%).

Entre as 100 amostras de doadores de sangue, houve uma amostra que reagiu com TESA no Dot-ELISA-Multi, que foi não reagente no teste de referência TESA-blot. Com os demais antígenos, as 100 amostras foram não-reagentes. Deste modo, a especificidade do teste foi de 99% (95%-

100%) com TESA e 100% (96%-100%) com os outros quatro antígenos utilizados no Dot-ELISA-Multi.

Entre as amostras de pacientes com leishmaniose, quatro (LMC = 3 e LC = 1) reagiram com os antígenos TESA e EAE. Esses quatro soros reagiram no TESA-Blot. Com os demais antígenos não houve reatividade. Estas amostras não foram consideradas no cálculo da especificidade do teste.

Tabela 8. Desempenho diagnóstico do Dot-ELISA-Multi para detecção de anticorpos IgG específicos anti-*T. cruzi*, anti-*T. pallidum*, anti-*P. vivax* e anti-*P. falciparum*. Os resultados são apresentados em número de pacientes positivos (n) e sensibilidade ou positividade (%).

Amostras (n)	Dot-ELISA-Multi n (%)				
	TESA	EAE	<i>Tp-Zw</i>	<i>PvMSP1₁₉</i>	<i>Pf-Zw</i>
Doença de Chagas (52)	52 (100)	52 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sífilis (43)	3 (7)	2 (5)	38 (88)	0 (0)	0 (0)
Malária (103)	10 (10)	5 (5)	6 (6)	72 (70)	31 (30)
Doadores de sangue (100)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Anticorpos heterólogos (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Leishmaniose (30)	4 (13)	4 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

2.3. DOT-ELISA-MULTI X TESTES UTILIZADOS COMO REFERÊNCIA

2.3.1. ANTICORPOS ANTI-*T. CRUZI*

Comparando-se a positividade do Dot-ELISA-Multi com os antígenos de *T. cruzi* com a positividade do TESA-blot, verificou-se que das 66 amostras reagentes com o antígeno TESA no Dot-ELISA-Multi, 63 foram confirmadas no TESA blot; destas 59 foram reagentes no Dot-ELISA-Multi com EAE. Em relação ao TESA-blot, foi observado um nível muito bom de concordância para os antígenos TESA ($\kappa= 0,964$) e EAE ($\kappa= 0,987$) no Dot-ELISA-Multi.

2.3.2. ANTICORPOS ANTI-*T. PALLIDUM*

Comparando-se a positividade do antígeno *Tp-Zw* no Dot-ELISA-Multi com a positividade do FTA-Abs, verificou-se que das 47 positivas no teste de referência, cinco amostras foram negativas no Dot-ELISA-Multi e das 44 positivas neste último teste, duas foram negativas no FTA-Abs. A concordância entre os testes foi de $\kappa= 0,895$.

2.3.3. ANTICORPOS ANTI-*P. VIVAX* E *P. FALCIPARUM*

Comparando-se a positividade dos antígenos *Pf-Zw* e *PvMSP1₁₉* no Dot-ELISA-Multi com a positividade desses mesmos antígenos no teste de referência ELISA, verificou-se que, com *Pf-Zw* apenas 57% (31 em 54) das amostras que reagiram no teste de referência foram reagentes no Dot-ELISA-Multi. Com *PvMSP1₁₉*, 96% (72 em 75) das amostras reagiram por ambos os testes. Em relação ao *PvMSP1₁₉*, foi observado um nível muito bom de concordância ($\kappa= 0,960$) e para *Pf-Zw*, um bom nível de concordância ($\kappa= 0,672$).

2.4. DOT-ELISA-MULTI NOS SUBGRUPOS DE MALÁRIA

A **tabela 9** apresenta os resultados obtidos nos subgrupos de malária. O Dot-ELISA-Multi *PvMSP1₁₉* apresentou 90% (77%-97%) de sensibilidade para as amostras de pacientes com parasitemia por *P. vivax*; enquanto que nas amostras de pacientes com *P. falciparum* o Dot-ELISA-Multi *Pf-Zw* mostrou 47% (28%-66%) de sensibilidade. No total, para as 65 amostras de pacientes com *P. vivax* e/ou *P. falciparum*, a sensibilidade do Dot-ELISA-Multi *PvMSP1₁₉* e/ou *Pf-Zw* foi 75% (63%-85%). Nas amostras de indivíduos com gota espessa negativa e relato de malárias anteriores, o Dot-ELISA-Multi apresentou 92% (79%-98%) de positividade, sendo 34% (20%-

51%) para *Pf-Zw* e 76% (60%-89%) para *PvMSP1₁₉*. Nas amostras de pacientes com infecção por *P. vivax* e sem relato de malárias anteriores, o Dot-ELISA-Multi apresentou 85% (62%-97%) de sensibilidade, sendo 5% (0%-25%) para *Pf-Zw* e 85% (62%-97%) para *PvMSP1₁₉*. Nas amostras de pacientes com malária por *P. vivax* com relato de malárias anteriores, o Dot-ELISA-Multi apresentou 100% (84%-100%) de sensibilidade, sendo 33% (15%-57%) para *Pf-Zw* e 95% (76%-100%) para *PvMSP1₁₉*. Nas amostras de pacientes com *P. falciparum* e sem relato de malárias anteriores, o Dot-ELISA-Multi apresentou 27% (8%-55%) de sensibilidade, sendo 13% (2%-40%) para *Pf-Zw* e 13% (2%-40%) para *Pv-MSP1₁₉*. Nas amostras de pacientes com malária por *P. falciparum* com relato de malárias anteriores, obteve-se 87% (60%-98%) de sensibilidade, sendo 67% (38%-88%) para *PvMSP1₁₉* e 80% (52%-96%) para *Pf-Zw*.

A sensibilidade do teste ELISA *Pf-Zw* em amostras de pacientes que tinham seu primeiro episódio de malária, quer por *P. vivax* ou *P. falciparum*, foi significativamente menor que nas amostras de pacientes que haviam tido episódios anteriores de malária. Por outro lado, o Dot-ELISA-Multi *Pf-Zw* apresentou sensibilidade significativamente maior apenas nas amostras de pacientes que haviam apresentado episódios anteriores de malária com parasitemia por *P. falciparum*. Ambos os testes mostraram sensibilidade semelhante com o antígeno for *PvMSP1₁₉* nas amostras de pacientes com parasitemia, independentemente se era o primeiro episódio de malária ou não (**tabela 10**).

Tabela 9. Desempenho diagnóstico do Dot-ELISA-Multi na detecção de anticorpos IgG específicos anti-*P. vivax* e anti-*P. falciparum*. Os resultados são apresentados em número de pacientes positivos (n) e sensibilidade ou positividade (%).

Subgrupos de malária (n)	Dot-ELISA-Multi n (%)			Testes de Referência n (%)		
	<i>Pf-Zw</i>	<i>PvMSP1₁₉</i>	<i>Pf-Zw</i> e/ou <i>PvMSP1₁₉</i>	ELISA <i>Pf-Zw</i>	ELISA <i>PvMSP1₁₉</i>	ELISA <i>Pf-Zw</i> e/ou <i>PvMSP1₁₉</i>
Gota espessa negativa (38)	13(34)	29(76)	35(92)	29*(76)	32*(84)	37(97)
Gota espessa positiva (65)	18(28)	43(66)	49(75)	25*(38)	44*(68)	50(77)
• ()**	8(20)	37(90)	38(93)	14(34)	37(80)	37(90)
Primeiro episódio de malária (20)	1(5)	17(85)	17(85)	2(10)	17(85)	17(85)
Episódios anteriores de malária (21)	7(33)	20(95)	21(100)	12(57)	20(95)	20(95)
• ()**	14(47)	12(40)	15(50)	16(53)	13(43)	19(63)
Primeiro episódio de malária (15)	2(13)	2(13)	4(27)	3(20)	3(20)	5(33)
Episódios anteriores de malária (15)	12(80)	10(67)	13(87)	13(87)	10(67)	14(93)

• * Nos testes de referência para anticorpos anti-*P. vivax* e anti-*P. falciparum*, 43 amostras reagiram com ambos os antígenos e 16 amostras não reagiram com nenhum dos dois antígenos.

• ** Seis amostras de pacientes com infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum* foram consideradas nos grupos de *P. vivax* e de *P. falciparum*.

Tabela 10. Sensibilidade (%) do ELISA e Dot-ELISA-Multi para anticorpos IgG em pacientes com infecção por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*

Teste	<i>Plasmodium vivax</i>			<i>Plasmodium falciparum</i>		
	Primeiro episódio %	Episódios anteriores %	p ^a	Primeiro episódio %	Episódios anteriores %	p ^a
ELISA Pf-Zw	5	50	0,005*	14	90	0,001*
ELISA PvMSP1₁₉	84	94	0,608	14	50	0,085
Dot-ELISA-Multi Pf-Zw	5	19	0,312	14	80	0,003*
Dot-ELISA-Multi PvMSP1₁₉	84	94	0,608	7	50	0,050

^a Teste exato de Fisher

* p < 0,05 – diferença estatisticamente significativa.

2.5. RELAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-*P. VIVAX* E ANTI-*P. FALCIPARUM* E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS

As amostras de pacientes com gota espessa negativa e que haviam relatado episódios anteriores de malária foram analisadas de acordo com a espécie *Plasmodium* envolvida no último episódio (**tabela 11**). Amostras de pacientes que tinham tido o último episódio de malária por *P. vivax* apresentaram associação negativa entre o tempo decorrido desde o último episódio de malária e resultados do ELISA PvMSP1₁₉ ($p = 0,00$) e do Dot-ELISA-Multi PvMSP1₁₉ ($p = 0,00$); enquanto que associação positiva foi observada entre o número de episódios de malária e resultados do ELISA Pf-Zw ($p = 0,00$) e Dot-ELISA-Multi Pf-Zw ($p = 0,00$). Indivíduos que tinham tido último episódio de malária por *P. falciparum* apresentaram associação positiva somente entre os resultados do Dot-ELISA-Multi Pf-Zw com o número de episódios de malária ($p = 0,00$). Quando o último episódio foi causado por *P. falciparum*, não houve associação nem no Dot-Elisa-Multi, nem no ELISA, com o antígeno PvMSP1₁₉ ($p > 0,5$).

Tabela 11. Associação entre testes sorológicos e dados epidemiológicos em amostras de pacientes com gota espessa negativa e relato de malárias anteriores.

Antígeno	Último episódio <i>P. vivax</i>		Último episódio <i>P. falciparum</i>	
	r	p	r	p
Antígeno <i>Pv-</i> MSP1₁₉				
ELISA x Número	-0,17	0,44	0,21	0,54
ELISA x Tempo	-0,68	0,00	-0,43	0,20
Dot- ELISA- Multi x Número	-0,31	0,14	0,00	1,00
Dot- ELISA- Multi x Tempo	-0,60	0,00	-0,38	0,26
Dot- ELISA- Multi x ELISA	0,65	0,00	0,87	0,00
Antígeno <i>Pf-Zw</i>				
ELISA x Número	0,71	0,00	0,68	0,25
ELISA x Tempo	-0,05	0,82	-0,42	0,21
Dot- ELISA- Multi x Número	0,62	0,00	0,80	0,00
Dot- ELISA- Multi x Tempo	0,27	0,20	-0,34	0,33
Dot- ELISA- Multi x ELISA	0,65	0,00	0,84	0,00

Número = número de episódios de malária; Tempo = tempo decorrido desde o último episódio de malária; $p < 0,05$ = associação significativa entre os parâmetros. Os dados epidemiológicos referem-se ao tempo decorrido desde o último episódio de malária e ao número de episódios em amostras de indivíduos com gota espessa negativa de dois grupos de moradores de áreas endêmicas, de acordo com a espécie de *Plasmodium* relatada no último episódio de malária.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste estudo, desenvolveu-se um teste imunoenzimático rápido, simples, sensível e específico para detecção de anticorpos contra *P. falciparum*, *P. vivax*, *T. cruzi* e *T. pallidum*. Essa multiplicidade do teste permite aplicá-lo em estudos epidemiológicos. (Eamsobhana et al., 2004). É um teste qualitativo em que se podem utilizar vários antígenos em único ensaio levando a redução de reagentes e amostras.

A padronização do Dot-ELISA separadamente para cada um dos antígenos estudados permitiu a determinação das melhores condições de reação, que foram sendo adequadas umas às outras a fim de se obter uma condição geral para o teste multiparamétrico. Na escolha das condições de reação, levou-se em conta, além da sensibilidade e especificidade, a visualização da reação.

Comparando-se os testes Dot-ELISA e Dot-ELISA-Multi, quanto aos níveis de sensibilidade e especificidade para um mesmo antígeno, verificou-se que houve discrepância entre os valores encontrados para a sensibilidade. Este fato foi devido à casuística utilizada, pois nos ensaios separados com cada antígeno, empregaram-se soros padrão e um número menor de amostras de painel, enquanto que no ensaio multiparamétrico foi testado um número maior de amostras de painel. Esta diferença ocorreu principalmente com os antígenos de *Plasmodium* para cuja padronização nos ensaios separados empregaram-se amostras com sorologia positiva

pelo teste ELISA com os respectivos antígenos, o que não ocorreu no teste multiparamétrico em que o critério de inclusão foi a gota espessa positiva ou o relato de malárias anteriores.

Nenhum dos soros de pacientes com anticorpos heterólogos e de indivíduos doadores de sangue reagiu com os antígenos EAE, *Pv*-MSP1₁₉, *Pf*-Zw e *Tp*-Zw no Dot-ELISA-Multi, nas condições padronizadas. Apenas uma amostra de doador de sangue reagiu com antígeno TESA. Portanto, o antígeno EAE foi mais específico que o TESA no Dot-ELISA-Multi, no grupo de doadores de sangue, provavelmente porque, no Banco de Sangue, as amostras de doadores haviam sido previamente triadas com testes que empregam formas epimastigotas de *T. cruzi*, mas não com TESA, que é um antígeno liberado por formas tripomastigotas em cultura. TESA e EAE possuem determinantes antigênicos diferentes; a maioria das moléculas liberadas ao meio de cultura pelas formas tripomastigotas pertence à sua superfície, enquanto que moléculas comuns aos dois antígenos não são de superfície (Umezawa et al., 2001).

A reatividade de uma fração complexa, como é o caso do TESA, depende da técnica empregada, como foi observado com outros antígenos (Umezawa et al., 1996a, b). Deste modo, a reatividade cruzada de alguns soros com determinado antígeno, pode ser evitada empregando-se técnicas diferentes, como ocorre com o antígeno TESA que não reage com soros de pacientes com leishmaniose pela técnica de WB (Umezawa et al., 2001), embora possa reagir nos testes ELISA e Dot-ELISA.

Em relação às amostras de pacientes com malária ou sífilis que reagiram com TESA e/ou EAE no Dot-ELISA-Multi e que foram confirmadas pelo TESA-Blot, não é possível afirmar com segurança que se trate de casos de doença de Chagas, embora se saiba da alta especificidade do TESA-Blot (Umezawa et al., 1996a; Neto et al., 2005; Frade, 2005), das formas de transmissão em comum e da sobreposição das áreas de transmissão. A região Amazônica, além de concentrar mais de 99% dos casos de malária registrados no país, apresentou entre 1998 e 2005, um aumento de 1,5% para 13,3% de casos de sífilis congênita notificados. Além disso, a região possui palmeiras de diversas espécies, *habitats* freqüentes de triatomíneos, transmissores da doença de Chagas, em áreas silvestres. (Boletim epidemiológico, AIDS e DST, 2006; Ministério da Saúde, malária, situação da doença no Brasil, 2006).

A ocasional presença de doença de Chagas nos indivíduos com leishmaniose, que reagiram com antígenos de *T. cruzi* no Dot-ELISA-Multi e foram confirmadas pelo TESA-Blot, é desconhecida e possivelmente improvável. Porém, essa “possível” falsa positividade atribuída à leishmaniose deverá ser mais bem investigada, pois não se conhece o histórico desses pacientes em relação à doença de Chagas.

Em relação ao antígeno *Tp-Zw* no Dot-ELISA-Multi, das seis amostras de indivíduos com histórico de malária que apresentaram reação, quatro reagiram com o FTA-Abs. Sabe-se que na malária, podem ocorrer falso-positivos em testes não-treponêmicos para sífilis (Rotta, 2005). Embora no

Dot-ELISA-Multi não tenham sido empregados antígenos lipídicos, a especificidade dessas amostras devem ser mais bem interpretadas. Segundo alguns autores, testes de hemaglutinação e WB podem ser aplicados como confirmatórios nessas amostras (Sambri et al, 2001, Rotta, 2005).

Os dados deste trabalho confirmam estudos prévios com as técnicas TESA blot (Umezawa et al., 1996a, b) e ELISA (Umezawa et al., 2001), mostrando 100% de sensibilidade para o Dot-ELISA-Multi com TESA em amostras de pacientes com doença de Chagas na fase crônica. O antígeno TESA, para emprego no teste ELISA, deve ser obtido a partir de meio de cultura sem soro fetal bovino (Umezawa et al., 2001). Por outro lado, no Dot-ELISA-Multi obteve-se maior sensibilidade com os antígenos TESA, obtidos a partir de culturas em RPMI com soro fetal bovino a 2%.

O Dot-ELISA-Multi apresenta algumas vantagens, quando comparado ao *Western blotting*, pois seu custo é menor, é de mais fácil execução, dispensando o SDS-PAGE e a transferência eletroforética para membranas de nitrocelulose. Além disso, pequenas quantidades de antígeno são suficientes para sensibilização da membrana de nitrocelulose e a técnica não requer equipamentos caros ou sofisticados (Noya e Alarcon de Noya, 1998).

Em relação às amostras de pacientes com sífilis, o Dot-ELISA-Multi apresentou 100% de sensibilidade em amostras de pacientes com as formas

latente recente e secundária. Este resultado está de acordo com o obtido em outros testes treponêmicos (Larsen et al., 1995; Marangoni et al., 2000; Castro et al., 2003), que, geralmente, dão resultados positivos devido à grande variedade de anticorpos contra os componentes antigênicos do *T. pallidum* (Lemos, 2002), que se observam nos soros dos pacientes nessas fases da sífilis.

As cinco amostras de sífilis não reagentes pelo Dot-ELISA-Multi, apresentavam reações de baixa intensidade de fluorescência (+1) no FTA-Abs, condição em que o teste de referência possui baixa especificidade (Larsen et al., 1986). Essas amostras não-reagentes apresentaram menos de três bandas imunodominantes no *Western blotting* para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. pallidum* (dados não apresentados). De acordo com alguns autores, o *Western blotting* deve ser considerado positivo quando três ou quatro dos antígenos com massa molecular de 15,5; 17, 44,5 e 47 kDa são detectados (Byrne et al., 1992, Backhouse e Nesteroff, 2001). Para outros autores, amostras reativas para pelo menos uma das bandas imunodominantes TpN47, Tp17 ou TpN15 devem ser consideradas positivas (Lemos, 2002).

A amostragem de sífilis primária e secundária estudada foi muito pequena para se tirar conclusões quanto à sensibilidade do Dot-ELISA-Multi nessas fases da doença. Apesar disso, sabe-se que na sífilis primária, a sensibilidade de testes cardiolipínicos e treponêmicos, como hemaglutinação

e FTA-Abs, é baixa, em torno de 44–76%, 50–83% e 75–92%, respectivamente (Goh, 2005).

Considerando-se a utilização do Dot-ELISA-Multi para triagem de doadores de banco de sangue, a sensibilidade encontrada de 88%, para sífilis, está aquém do desejável, porém deve-se salientar que as amostras de soro empregadas fazem parte de um painel de soroteca e encontravam-se glicerizadas, o que pode ter afetado a sua reatividade com o *Tp-Zw*. Deste modo, o próximo passo será a aplicação do ensaio em amostras frescas. Porém, não se deve esquecer que um ponto crítico no diagnóstico da sífilis são os baixos títulos de anticorpos específicos observados.

Como era de esperar, nas amostras do grupo de malária, a positividade do Dot-ELISA-Multi foi maior para o antígeno *PvMSP1₁₉* ($p < 0,0001$), pois *P. vivax* é a espécie mais prevalente no Brasil (OMS, 2005). A positividade do ELISA *Pf-Zw* foi significativamente maior ($p = 0,002$) que no Dot-ELISA-Multi *Pf-Zw*. Porém, 70% das amostras não reagentes no teste multiparamétrico eram de pacientes que tinham tido o último episódio de malária por *P. vivax*. Além disso, em amostras de indivíduos com gota espessa negativa, 88% das amostras negativas no Dot-ELISA-Multi *Pf-Zw* foram reagentes no Dot-ELISA-Multi *Pv-MSP1₁₉* e as outras três amostras eram de indivíduos que tinham tido o último episódio de malária há mais de um ano (*P. falciparum*) ou dois (*P. vivax*) da coleta.

Como já havia sido verificado por outros autores (Soares et al., 1999a; Morais et al., 2005), uma proporção significativa de indivíduos expostos naturalmente à malária, mas sem parasitemia, apresentaram anticorpos IgG específicos contra PvMSP1₁₉, como detectado no Dot-ELISA-Multi (76%) e ELISA (84%). Entretanto, a persistência desses anticorpos ainda é uma questão que deve ser mais bem estudada. Utilizando outro recombinante produzido em bactéria, baseado no PvMSP1₁₉ (GST-ICB10), Soares et al. (1999a), verificaram que os títulos de anticorpos diminuíam de um modo relativamente rápido, após o tratamento. Contudo, alguns autores têm mostrado que anticorpos específicos contra PvMSP1₁₉ permanecem por longo período de tempo após a infecção (Lim et al., 2004).

Não foi observada associação entre o número de episódios de malária e a reatividade ao antígeno PvMSP1₁₉, pois esta já é elevada nos pacientes que estão com malária pela primeira vez. Por outro lado, foi observada uma associação negativa entre a reatividade ao antígeno PvMSP1₁₉ e o tempo decorrido desde o último episódio de malária por *P. vivax*, mas não por *P. falciparum*, confirmando a alta especificidade do PvMSP1₁₉ (Rodrigues et al., 2003; Morais et al., 2005). Os resultados do Dot-ELISA-Multi Pf-Zw mostraram uma associação positiva com o número de episódios de malária, independentemente da espécie envolvida no último episódio, sugerindo uma reatividade cruzada entre o antígeno Pf-Zw e os anticorpos produzidos nas infecções por *P. vivax*.

O Dot-ELISA-Multi PvMSP1₁₉ apresentou 90% de sensibilidade em pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*. Três das quatro amostras não-reagentes eram de pacientes que tinham malária pela primeira vez o que pode refletir que um atraso no *switch* de IgM para IgG. Entre pacientes com gota espessa positiva para *P. falciparum*, os resultados foram bem diferentes, pois a baixa sensibilidade do Dot-ELISA-Multi Pf-Zw (47%) foi devida aos baixos níveis de anticorpos específicos detectados em pacientes que apresentam o primeiro episódio de malária.

Considerando ambos os antígenos de *Plasmodium*, a sensibilidade geral em amostras de pacientes com gota espessa positiva foi de 75%. A baixa sensibilidade obtida com o antígeno Pf-Zw na malária por *P. falciparum* está de acordo com outros trabalhos (Slinger et al., 2001), visto que nos primeiros dias após a infecção os níveis podem ser muito baixos e não detectáveis pelos testes sorológicos (Kitchen e Chiodini, 2006). Além disso, a duração do tempo de sintomas foi de 5 dias ou menos em 73% dos pacientes cujas amostras foram não-reagentes no teste. A sensibilidade com antígeno PvMSP1₁₉ em soros de pacientes com primeira infecção por *P. vivax* (84%) também está de acordo com resultados obtidos por outros autores (Rodrigues et al., 2003).

O antígeno PvMSP1₁₉ apresentou sensibilidade semelhante em amostras de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, quer apresentando o primeiro episódio de malária ou tendo sofrido episódios anteriores ($p = 0,608$), corroborando com a idéia de que um único episódio

de malária desencadeia resposta de anticorpos específicos na grande maioria dos indivíduos (Rodrigues et al., 2003). Este comportamento não foi observado em amostras de pacientes infectados por *P. falciparum*, em que se obteve menor sensibilidade para anticorpos específicos no grupo de pacientes com primeiro episódio de malária ($p = 0,03$).

No caso das amostras incluídas no grupo da malária, em que nem todas eram reagentes pelo teste de referência, verificou-se que com PvMSP1₁₉, 96% (72 entre 75) das amostras foram reagentes pelo ELISA e Dot-ELISA-Multi, enquanto que com Pf-Zw, apenas 57% (31 entre 54) das amostras reagiram com ambos os testes. Deve-se salientar que, no caso do PvMSP1₁₉, o mesmo lote de antígeno foi empregado nos dois testes, o que não ocorreu com o Pf-Zw, em que os lotes foram diferentes.

Em relação ao antígeno Pf-Zw, deve-se salientar que a detecção de anticorpos específicos necessita ser melhorada, talvez empregando proteínas recombinantes.

Para PvMSP1₁₉, embora não se tenha obtido sensibilidade máxima, o teste pode ser útil em estudos epidemiológicos, na triagem de amostras de sangue e no diagnóstico sorológico da malária por *P. vivax*, pois não apresenta reação cruzada com anticorpos produzidos na malária por *P. falciparum* (Rodrigues et al., 2003). Em bancos de sangue, o principal risco de contaminação advém de indivíduos semi-imunes, que geralmente são assintomáticos e convivem com altos níveis de anticorpos e baixas

parasitemias. Por outro lado, indivíduos com parasitemia decorrente do primeiro episódio de malária ou não-ímmunes geralmente apresentam sintomas característicos e, dificilmente se candidatam a doação ou seriam rejeitados durante a entrevista (Kitchen e Chiodini, 2006).

A comparação entre os resultados, em amostras negativas e positivas, do Dot-ELISA-Multi com os respectivos testes utilizados como referência mostrou haver um nível de concordância muito bom para os antígenos TESA, EAE, *Pv*-MSP1₁₉ e *Tp*-Zw. A concordância com *Pf*-Zw foi boa.

Concluindo, o teste multiparamétrico Dot-ELISA (Dot-ELISA-Multi), aqui apresentado, é muito útil e de fácil execução; utiliza pequenas quantidades de antígeno, pode ser aplicado em condições de campo onde não haja recursos ou equipamentos sofisticados e permite a leitura a olho nu.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Foi padronizado um ensaio multiparamétrico, Dot-ELISA-Multi, para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*P. falciparum*, anti-*P. vivax*, anti-*T. cruzi* e anti-*T. pallidum* em amostras de soro.
2. O Dot-ELISA-Multi mostrou elevada sensibilidade para Doença de Chagas Crônica, Sífilis Latente Recente, Sífilis Secundária e Malária por *Plasmodium vivax*.
3. O Dot-ELISA-Multi mostrou elevada especificidade em pacientes com anticorpos heterólogos e em indivíduos “saudáveis” (doadores de banco de sangue).
4. Não foi possível confirmar ou descartar a presença de Doença de Chagas nas amostras de leishmaniose, malária e sífilis, que reagiram com TESA e/ou EAE no Dot-ELISA-Multi.
5. O Dot-ELISA-Multi apresentou elevado grau de concordância com os testes utilizados como referência para os antígenos TESA, EAE, PvMSP1₁₉ e Tp-Zw.
6. Não houve associação entre o número de episódios de malária e a reatividade ao antígeno PvMSP1₁₉, pois esta já é elevada nos pacientes que estão com malária pela primeira vez.

7. Houve associação negativa entre a reatividade ao antígeno PvMSP1₁₉ e o tempo decorrido desde o último episódio de malária por *P. vivax*
8. O antígeno PvMSP1₁₉ foi altamente específico, apresentando baixa reatividade com anticorpos produzidos em infecção por *P. falciparum*.
9. Houve associação positiva entre a reatividade ao antígeno Pf-Zw e o número de episódios de malária, independentemente da espécie envolvida no último episódio.
10. O antígeno Pf-Zw apresentou reatividade cruzada com anticorpos produzidos nas infecções por *P. vivax*.
11. O antígeno PvMSP1₁₉ apresentou sensibilidade semelhante em amostras de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax*, quer apresentando o primeiro episódio de malária ou tendo sofrido episódios anteriores.
12. O antígeno Pf-Zw apresentou sensibilidade menor em amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* que apresentavam o primeiro episódio de malária.
13. O antígeno Pf-Zw não foi útil para os pacientes com *P. falciparum* que estavam tendo malária pela primeira vez.

ANEXOS

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I-DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:...

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).

RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:...

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Padronização de teste multiparamétrico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, anti-*T.pallidum*, anti-*P.vivax* e anti-*P. falciparum*, empregando a técnica de Dot-ELISA.

2. **PESQUISADOR:** Antonio Walter Ferreira

CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRF:11.806

3. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:** risco mínimo

4.**DURAÇÃO DA PESQUISA:** 36 meses

III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Neste estudo pretendemos padronizar um ensaio multiparamétrico para pesquisa de anticorpos para sífilis, malária e doença de Chagas, utilizando a técnica de Dot-ELISA. Para isso, precisamos de amostras de pacientes com malária, leishmaniose, anticorpos heterólogos, sífilis e doença de Chagas que foram cedidas e colhidas conforme consentimentos. Os resultados obtidos poderão acrescentar informações importantes no conhecimento das doenças e poderá beneficiar no futuro todas as pessoas que estão expostas à malária, doença de Chagas e sífilis.

IV- ESCLARECIMENTOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. disponibilidade de assistência nos serviços de saúde, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

4. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V- INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,dede 2003.

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

Antonio Walter Ferreira
Pesquisador

Anexo II

Dados dos pacientes com sífilis (NR= não reagente; R= reagente).

AMOST	CLINICA	Western-Blotting						Fta-Abs	TPHA	VDRL	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot
		WB TpN47	WB TpN15	WB TpN31	WB TpN14	WB TpN25-30	WB TpN30-35				EAE	TESA	Pf-Zw	Pv-MSP1 ₁₉	Tp-Zw	
1	SLR	X	X	X	X	X	X	POS	POS	2	NR	NR	R	NR	R	
7	SLR		X	X			X	POS	POS	4	NR	NR	NR	NR	R	
10	SS	1	X	1		X	X	POS	POS	8	NR	R	NR	NR	R	R
14	SLT	1	X	1				POS	POS	4	R	R	NR	NR	R	R
16	SS	X	X	1	X	X	1	POS	POS	32	NR	NR	NR	NR	R	
17	SP	X	1					POS	320	4	NR	NR	NR	NR	NR	
18	SLT	X	X	1				POS	POS	4	NR	NR	NR	NR	R	
21	SLT	1	X	1				POS	POS	1	NR	NR	NR	NR	R	
25	SLT	X	X	X				POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
26	SLT	X	X	X			X	POS	POS	2	NR	NR	NR	NR	R	
29	SLT	X	X	X	X			POS	POS	4	NR	NR	NR	NR	NR	
30	SP	1	1					POS	POS	8	NR	NR	NR	NR	R	
31	SLR	X	X	X	1	X		POS	POS	8	NR	NR	NR	NR	R	
33	SS	X	X	X	X	X	X	POS	POS	256	NR	NR	NR	NR	NR	
34	ST	X						POS	2		NR	NR	NR	NR	R	
36	SS	X	X	X	X		X	POS	POS	128	NR	NR	NR	NR	R	
37	SLT	X	X	X				POS	POS	4	NR	NR	NR	NR	R	
38	SLR	X	X	X	X		X	POS	POS	2	NR	NR	NR	NR	R	

39	SLR	X	X	X	X			POS	POS	8	NR	NR	NR	NR	R	
40	SLR	X	X	X	X	X		POS	POS	2	NR	NR	NR	NR	R	
42	SLR	1	X	1	X	X		POS	1280	0	NR	NR	NR	NR	R	
43	SLR	X	X	X		X	X	POS	640	4	NR	NR	NR	NR	R	
44	SS	X	X	X	X	X	X	POS	2560	16	NR	NR	NR	NR	R	
46	ST	1	X					POS	80	0	NR	NR	NR	NR	R	
47	SLT	X	X	X				POS	640	1	R	R	NR	NR	R	R
50	SLT	X	X	X				POS	2560	4	NR	NR	NR	NR	NR	
51	SLR	X	X	X	X	X		POS	2560	1	NR	NR	NR	NR	R	
54	SLR	X	X	X	X		X	POS	2560	4	NR	NR	NR	NR	R	
55	SLT	1	X	1				POS	640	4	NR	NR	NR	NR	R	
56	SLT	X	X	X	X		X	POS	2560	8	NR	NR	NR	NR	R	
57	SS	X	X	X	X	X	X	POS	10240	64	NR	NR	NR	NR	R	
59	SLT	X	X	X	1	X	X	POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
60	SLT	X	X	1	1			POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
61	SLR	X	X	1	1		1	POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
62	SLT	1	X	1	1			POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
63	SLT	1	X	X	1			POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
66	SLT	1	X	1				POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	R	
69	SS	X	X	X	X	X	X	POS	POS	8	NR	NR	NR	NR	R	
70	ST		X	1				POS	POS	0	NR	NR	NR	NR	NR	
73	SLT	1	X	1	X			POS	POS	2	NR	NR	NR	NR	R	
76	ST	X	X	1			X	POS	POS	8	NR	NR	NR	NR	R	
77	SLR	X	X	1			X	POS	POS	2	NR	NR	NR	NR	R	

Anexo III

Dados pessoais dos pacientes sem parasitemia com relatos de malárias anteriores

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Tempo no Local	Tempo da última malária (espécie)	IFI (Pf)	IFI (Pv)	Gota	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot
										EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw	
55	32	Alta Floresta	10 anos	8 dias (pf)	10240	320	Neg	12,5	13,3	NR	NR	R	R	NR	
342	30	Alta Floresta	11 anos	2 anos (pv)	10240	40	Neg	13,6	0,1	NR	NR	NR	R	NR	
108-B	30	Alta Floresta	5 anos	15 dias (pf)	10240	20	Neg	9,5	1,3	NR	NR	NR	R	NR	
136	15	Alta Floresta	6 anos	6 meses (pf)	10240	640	Neg	13,9	15,3	NR	R	R	R	NR	R
170	50	Alta Floresta	1,16 anos	8 meses (?)	10240	160	Neg	9,7	3,0	NR	NR	R	R	NR	
140	30	Alta Floresta	8 anos	1 ano (pf)	10240	320	Neg	12,1	1,0	R	NR	NR	R	NR	R
148	60	Alta Floresta	5 anos	1 ano (pv)	10240	160	Neg	13,3	1,0	NR	NR	NR	R	NR	
153	60	Alta Floresta	5 anos	1,5 anos	10240	320	Neg	11,6	1,7	NR	NR	R	R	NR	
106	?	Alta Floresta	10 anos	?	5120	Neg	Neg	9,7	0,6	NR	NR	NR	R	NR	
147	20	Alta Floresta	1 ano	1,2 anos (pf)	5120	Neg	Neg	8,2	1,7	NR	NR	NR	R	NR	
287	7	Alta Floresta	13 anos	1 ano (pf)	Neg	Neg	Neg	6,7	0,6	NR	NR	NR	NR	NR	
59	7	Alta Floresta	13 anos	1,5 anos (pf)	Neg	Neg	Neg	6,9	0,5	NR	NR	NR	NR	NR	
155	40	Alta Floresta	9 anos	1,1 ano (pv)	Neg	Neg	Neg	5,1	3,4	NR	NR	R	R	NR	
166	2	Alta Floresta	11 anos	5 meses (pv)	Neg	320	Neg	0,5	18,8	NR	NR	R	NR	NR	

309	4	Alta Floresta	8 anos	20 dias (pv)	Neg	160	Neg	1,0	13,6	NR	NR	R	NR	NR	
43	8	Alta Floresta	9 anos	5 meses (pv)	Neg	160	Neg	2,8	6,7	NR	NR	R	NR	NR	
125-B	3	Alta Floresta	8 anos	2 anos (pv)	Neg	160	Neg	0,9	14,7	NR	NR	R	NR	NR	
42	5	Alta Floresta	9 anos	3 meses (pv)	Neg	80	Neg	0,8	5,1	NR	NR	R	NR	NR	
78	1	Alta Floresta	18 anos	2 anos (pv)	Neg	80	Neg	0,5	0,8	NR	NR	NR	NR	NR	
389	2	Alta Floresta	1 ano	10 dias (pv)	Neg	80	Neg	0,4	9,2	NR	NR	R	NR	NR	
236	4	Alta Floresta	18 anos	2,5 anos (pf)	Neg	80	Neg	0,2	11,3	NR	NR	R	NR	NR	
144	2	Alta Floresta	13 anos	4 meses (pv)	Neg	80	Neg	0,4	7,9	NR	NR	R	NR	NR	
101	12	Alta Floresta	10 anos	1ano e 4 m (pf)	Neg	80	Neg	2,8	7,1	R	R	R	NR	NR	R
336	20	Alta Floresta	9 anos	15 dias (pv)	160	10240	Neg	3,5	22,7	NR	NR	R	NR	NR	
318	15	Alta Floresta	10 anos	10 dias (pv)	160	5120	Neg	1,4	20,4	NR	NR	R	NR	NR	
251	20	Alta Floresta	9 anos	7 dias (pv)	2560	2560	Neg	13,4	22,0	NR	R	R	R	NR	R
153	30	Alta Floresta	8 anos	15 dias (pv)	320	2560	Neg	1,9	22,2	NR	NR	R	NR	NR	
126	6	Alta Floresta	9 anos	15 dias (pv)	320	2560	Neg	3,1	22,5	NR	NR	R	NR	NR	
404	2	Alta Floresta	11 anos	13 dias (pv)	160	2560	Neg	3,0	11,1	NR	NR	R	NR	NR	
260	2	Alta Floresta	1 ano	1 mes(pv)	80	2560	Neg	2,4	18,6	NR	NR	R	NR	NR	
395	2	Alta Floresta	6 anos	15 dias (pv)	80	2560	Neg	1,0	23,4	NR	NR	R	NR	NR	

252	2	Alta Floresta	1 a e 4 me	7 dias (pv)	80	2560	Neg	1,4	24,4	NR	NR	R	NR	NR	
8	20	Alta Floresta	18 anos	20 dias (pf)	2560	2560	Neg	4,9	10,8	NR	NR	R	R	NR	
255	2	Alta Floresta	13 anos	1 mes de (pv)	80	1280	Neg	1,1	23,1	NR	NR	R	NR	NR	
135	3	Alta Floresta	4 anos	3 dias (pv)	80	1280	Neg	1,3	23,0	NR	NR	R	NR	NR	
391	2	Alta Floresta	17 anos	12 dias (pv)	40	1280	Neg	0,7	16,8	NR	NR	R	NR	NR	
58	21	Alta Floresta	13 anos	1,5 anos (?)	160	640	Neg	3,4	17,4	NR	NR	R	NR	NR	
313	3	Alta Floresta	11 anos	45 dias (pv)	160	640	Neg	1,0	18,8	NR	NR	R	NR	NR	

Anexo IV

Dados pessoais dos pacientes com gota espessa positiva (*P. vivax*) sem relatos de malárias anteriores (primo-infectados).

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Gota (Pv)	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot
						EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw	
3B	0	Belém	10000	1,2	1,6	NR	R	R	R	NR	NR
4B	0	Belém	3500	0,7	2,1	NR	NR	R	NR	NR	
6B	0	Belém	1500	0,9	2,5	NR	R	R	NR	NR	R
10B	0	Belém	4500	0,5	2,4	NR	NR	R	NR	NR	
52B	0	Belém	2000	0,8	1,7	NR	NR	R	NR	NR	
12B	0	Belém	9500	0,7	2,6	NR	NR	R	NR	NR	
17B	0	Belém	1000	1,0	2,1	NR	NR	R	NR	NR	
19B	0	Belém	3500	0,9	2,2	NR	NR	R	NR	NR	
21B	0	Belém	4000	0,2	1,3	NR	NR	R	NR	NR	
22B	0	Belém	6500	0,5	1,7	NR	NR	R	NR	NR	
24B	0	Belém	500	0,4	0,2	NR	NR	NR	NR	NR	
25B	0	Belém	4000	0,3	1,8	NR	NR	R	NR	NR	
26B	0	Belém	1000	0,5	2,6	R	R	R	NR	NR	R
30B	0	Belém	200	0,2	0,8	NR	NR	NR	NR	NR	
31B	0	Belém	2000	0,5	2,6	NR	NR	R	NR	NR	
32B	0	Belém	2000	0,4	1,1	NR	NR	R	NR	NR	
39B	0	Belém	1500	0,3	0,3	NR	NR	NR	NR	NR	
42B	0	Belém	1500	0,5	2,1	NR	NR	R	NR	NR	
44B	0	Belém	10000	0,4	2,1	NR	R	R	NR	NR	R

Anexo V

Dados pessoais dos pacientes com gota espessa positiva (*P. vivax*) com relatos de malárias anteriores.

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Tempo no Local	Tempo da última malária	IFI (Pf)	IFI (Pv)	Gota	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot	FTA-Abs
										EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw		
7	40	Alta Floresta	18 anos	Atual	160	2560	PV 2+	3,2	2,4	NR	NR	2	NR	R		R
14-B	Muitas	Alta Floresta		2 anos	Neg	160	Pv 2+	0,6	2,3	NR	NR	2	NR	NR		
8	25	Alta Floresta	19 anos	2 anos (PV)	40	160	Pv 2+	0,8	2,4	NR	NR	2	NR	NR		
30 B	200	Alta Floresta	8 anos	20 dias	160	160	Pv 2+	0,9	1,4	NR	NR	2	NR	NR		
10		Iguarapé Açu					+/ 2V	1,1	27,2	NR	NR	2	R	NR		
8	1	Belém		8 meses (pv)			v 5000	1,6	14,9	NR	NR	2	NR	NR		
13	1	Belém		10 anos			v 6000	0,1	9,9	NR	NR	2	NR	NR		
15	2	Belém		1 ano (pv)			v 500	1,4	14,0	NR	NR	R	NR	NR		
20	1	Belém		9 meses (pv)			v 5000	1,1	14,5	NR	NR	R	NR	NR		
34	2	Belém		1 ano			v 1500	1,7	14,2	NR	NR	R	NR	NR		
35	1	Belém		10 ano			v 4000	0,1	0,5	NR	NR	R	NR	NR		
36	4	Belém		3 meses			v 10000	0,4	12,9	NR	NR	R	NR	NR		
37	7	Belém		6 meses (pv, pv)			v 6000	3,5	4,2	NR	NR	NR	R	NR		
45	1	Belém		3 meses (pv)			v 5000	1,0	14,3	NR	NR	R	NR	NR		
50	2	Belém		13 meses			v 5000	0,6	14,0	NR	NR	R	NR	NR		
60	1	Belém					v 2500	1,1	14,9	NR	NR	R	R	NR		

Anexo VI

Dados pessoais dos pacientes com gota espessa positiva (*P. falciparum*) sem relatos de malárias anteriores (primo-infectados).

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Local de infecção	Local onde reside	IFI (Pf)	IFI (Pv)	Gota	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot	FTA-Abs
										EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw		
190	0	Alta Floresta			10	10	Pf60/mm ³	0,1	0,2	NR	NR	NR	NR	NR		
752/84	0	Sucen	Ariquemis RO	SP	40			0,5	0,7	NR	NR	NR	NR	NR		
385/85	0	Sucen	Colider MT	SP	10		4080	0,5	0,2	NR	NR	NR	NR	NR		
196/85	0	Sucen	Lagos Nigéria	em trânsito	10		22040	0,3	1,7	NR	NR	NR	NR	NR		
781/85	0	Sucen	Ariquemis RO	em trânsito	10		3840	0,2	0,2	NR	NR	NR	NR	NR		
12/86	0	Sucen	Redenção PA	SP			22560	0,9	3,5	NR	NR	R	NR	NR		
33/86	0	Sucen	Ariquemis RO	SP			47640	0,2	0,5	NR	NR	NR	NR	NR		
17/89	0	Sucen	Amazônia Legal	SP			27120	0,3	0,9	NR	NR	NR	NR	NR		
5/86	0	Sucen	Ariquemis RO	SP			12000	0,2	0,8	NR	NR	NR	NR	R		R
27/02	0	Sucen	Abdjan Costa do Marfim	SP			21840/1080	6,7	0,8	NR	R	NR	R		R	
32/04	0	Sucen	Manaus AM	SP			28080	0,3	0,7	NR	NR	NR	NR	NR		
34/86	0	Sucen	Humaitá AM	SP			5280	0,2	0,5	NR	NR	NR	NR	NR		
18/89	0	Sucen	Alta Floresta MT	SP			4960	0,3	0,0	NR	NR	NR	NR	NR		
110/05	0	Sucen	Porto Velho RO	São Vicente			12320/240	3,2	0,3	NR	NR	NR	R	NR		

Anexo VII

Dados pessoais dos pacientes com gota espessa positiva (*P. falciparum*) com relatos de malárias anteriores.

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Local de infecção	Local onde reside	Tempo da última malária	IFI (Pf)	IFI (Pv)	Tempo de sintomas	Gota	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot	FTA-Abs
												EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw		
109-b	20	Alta Floresta			Atual	1280	10		Pf 12000/mm3	1,4	0,6	NR	NR	NR	R	NR		
265/85	20	Sucen	Colider MT	SP	pv	1280	NR	27 dias	Pf incontáveis	7,0	3,8	NR	NR	R	R	R		NR
628/85	3	Sucen	Ariquemes RO	SP		5120	NR	1 dia	Pf 9000 120g	9,4	14,9	R	R	R	R	R	R	NR
884/85	varias	Sucen	Porto Velho RO	SP	pv	10240	NR	13 dias		2,9	4,5	NR	NR	R	R	R		R
401/86	2	Sucen	Itaituba PA	SP	pf	10240	NR	4 dias	Pf 21.960	9,9	0,6	NR	NR	NR	R	NR		
118/87	10	Sucen	São Felix do Xingu PA	em trânsito	pf	10240	NR	1 dia	Pf 12.000 120g	9,7	3,5	NR	NR	R	R	NR		
912/87	7	Sucen	Ariquemes RO	em trânsito	pf	1280	NR	2 dias	Pf 40.080 120g	5,3	4,5	NR	NR	R	R	NR		
130 B	16	Alta Floresta			11 meses Pf	20	10		Pf 240mm3	1,1	0,1	NR	NR	NR	NR	NR		
92 B	2	Alta Floresta			4 meses Pv	80	10		Pf 120/mm3	0,7	0,7	NR	NR	NR	NR	NR		
117	20	Alta Floresta			2anos Pv	640	160		Pf 60/mm3	5,2	0,9	NR	NR	NR	R	NR		

Anexo VIII

Dados pessoais dos pacientes com gota espessa positiva (*P. falciparum* e *P. vivax*) com e sem relatos de malárias anteriores.

Amostra	Número de malárias anteriores	Local	Local de infecção	Local onde reside	Tempo no local	Tempo da última malária	IFI (Pf)	IFI (Pv)	Tempo de sintomas	Gota	ELISA Pf-Zw	ELISA Pv-MSP19	Dot-ELISA-Multi					TESA-Blot	FTA-Abs
													EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw		
330	10	Alta Floresta			16 anos	1 mês (pv)	160	80		Pv +/2 Pf 3480m ³	1,3	10,8	NR	NR	R	0			
239/85	2	Sucen	Conceição do Araguaia PA	em trânsito		pv	2560		6 dias	360G/PV 2+/48360 PF	2,6	10,5	NR	NR	R	R			
360/85	7	Sucen	Colider MT	em trânsito		pf	10240		9 dias	Pv 2+/56440 pf	7,0	10,8	NR	NR	R	R	R	R	
393/85	0	Sucen	Ariquemis RO	Guarulhos		primo	320	NR	22 dias	Pv 3+ Pf 1440	0,9	2,6	R	R	R	0		R	
389/85	5	Sucen	Colider MT	Francisco Morato		pv	10240		7 dias	Pv 3+ pf/120g	5,7	2,8	NR	NR	R	R			
302/85	15	Sucen	Colider MT	SP		pf	2560	NR	7 dias	244450 pf 480g	1,9	13,3	NR	NR	R	R			

Anexo IX

Dados dos pacientes com doença de Chagas (fase crônica).

Amostra	ELISA	Hemoaglutinação	TESA-Blot	Dot-ELISA-Multi				
				EAE	TESA	Pv-MSP19	Pf-Zw	Tp-Zw
CBU 12CH	10,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 40CH	4,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 42CH	10,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 44CH	6,3	R (1/20)	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 45CH	9,5	R (1/640)	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 46CH	10,2	R (1/160)	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 55CH	5,2	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 70CH	9,9	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 71CH	4,4	R	R	R	R	NR	NR	NR
CBU 72CH	11,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 1/98	7,5	R (1/160)	R	R	R	NR	NR	NR
CH 10/93	6,6	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 2/93	5,9	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 2/98	12,2	R (1/640)	R	R	R	NR	NR	NR
CH 3/93	11,0	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 4/93	12,1	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 4/98	10,3	R (1/320)	R	R	R	NR	NR	NR
CH 5/98	10,6	R (1/320)	R	R	R	NR	NR	NR
CH 6/93	10,4	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 6/98	10,3	R (1/320)	R	R	R	NR	NR	NR
CH 7/93	12,6	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 8/93	9,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
CH 9/93	10,9	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 282	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 383	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 416	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 554	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 579	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 604	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 613	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 662	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
F 689	R	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 554	7,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 555	6,9	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 556	6,9	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 560	7,4	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 564	6,1	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 565	5,1	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 567	7,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 569	4,9	R	R	R	R	NR	NR	NR

STC 571	5,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 574	8,0	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 578	8,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 579	6,7	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 583	6,3	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 587	4,4	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 591	5,2	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 595	6,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 602	5,8	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 606	6,6	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 608	6,0	R	R	R	R	NR	NR	NR
STC 611	5,2	R	R	R	R	NR	NR	NR

Anexo X

Carta de aceitação do trabalho " A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease and syphilis specific IgG antibodies" enviado à revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

From: "Diagn Microbiol Infect Dis" <dmid@jmilabs.com>

To: <arroyo@usp.br>

Sent: Tuesday, December 12, 2006 2:07 PM

Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: DMID-06-226R1

Title: A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria,

Chagas disease and syphilis specific IgG antibodies

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Dear Dr. Sanchez,

I wish to confirm acceptance your paper "A multianalyte Dot-ELISA for

simultaneous detection of malaria, Chagas disease and syphilis specific

IgG antibodies" in *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

The editors and staff of *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*

wish to thank you for submitting this manuscript. Please consider the journal in the future for the publication of your excellent work in this field.

With kind regards,

Thomas R. Fritsche, MD, PhD

Associate Editor

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

Alderete JK, Freeman-Shade L, Baseman JB (1985). Immunodiagnostic test for detection of serum antibody to *Treponema pallidum* (Syphilis): Fibronectin as a capture vehicle for treponemal adhesions. *J Immun Methods*. 84: 365-73.

Alecrim MGC. *Estudo clínico e terapêutico da malária pelo Plasmodium vivax e avaliação do polimorfismo no Estado do Amazonas* [tese]. Brasília: Universidade de Brasília: 2000

Anand T, Raju TAN, Vishnu C, Rao LV, Sharma G. Development of Dot-ELISA for the detection of human rotavirus antigen and comparison with RNA-PAGE. *Lett Appl Microbiol*. 2001; 32: 176-80.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 71-80.

Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Molecular Immunol*. 2001; 38: 443-55.

Ávila PE, Kirchgatter K, Brunialti CS, Oliveira AM, Siciliano F, Di Santi SM. Evaluation of a Rapid Dipstick Test, Malar-Check™, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* Malaria in Brasil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002; 293-96.

Ávila SLM, Ferreira AW. Malária. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2º ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001. p.263-73.

Ávila SLM, Tozetto-Mendoza TR, Arruk VG, Ferreira AW. Standardization of procedures of *Plasmodium falciparum* antigen preparation for serologic tests. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998; 40: 309-16.

Backhouse JL, Nesteroff SI. *Treponema pallidum* western blot: Comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 39: 9-14.

Belizario VY, Pasay CJ, Bersabe MJ, Leon WU, Guerrero DM, Bugaoisan VM. Field evaluation of malaria rapid diagnostic tests for the diagnosis of *P. falciparum* and non-*P. falciparum* infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36: 552-61.

Blackman MJ, Chappel JA, Shai S, Holder AA. A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 62: 103-114.

Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med.* 1990; 172: 379-382.

Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol.* 1991a; 49: 29-34

Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med.* 1994; 180: 389-393.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248.

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, Lal AA. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 211-219.

Branquinho MS, Marrelli MT, Natal ICD, Barata JMS, Tubaki R, Carréri-Bruno GC, Menezes RT, Kloetzel JK. Infection of Anopheles (Kerteszia) cruzii with Plasmodium vivax and Plasmodium vivax variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Juquitiba, São Paulo. *Rev Panam Salud Publica.* 1997; 2: 189-93.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de políticas da Saúde. Coordenação de DST e AIDS. ANO III. Nº 01-01^a a 26^a semanas epidemiológicas – janeiro a junho, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38 (supl III).

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde (FUNASA). Publicações Técnicas e Científicas. Centro Nacional de Epidemiologia. *Guia de Vigilância Epidemiológica – Malária*, 4^a ed. Brasília, 1998.

Brasil. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Departamento de Erradicação e Controle de Endemias. Divisão de Doença de Chagas, 1989.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas, 2006

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária, 2006.

Brown, C. R., Higgins K.W., Frazer K., et al., Simultaneous determination of total IgE and allergen-specific IgE in serum by the MAST chemiluminescent assay system. *Clin. Chem.* 31:1500-5,1985.

Brown DL, MAJ MC, Jennifer E, Frank CPT. Diagnosis and Management of syphilis. *Am Fam Phys.* 2003; 68: 283-90.

Byrne RE, Laska S, Bell M, Larson D, Phillips J, Todd J. Evaluation of a *Treponema pallidum* Western Immunoblot Assay as a Confirmatory Test for Syphilis. *J Clin Microbiol.*1992; 30: 115-22.

Castro A, Luquetti A, Rassi A, Rassi G, Chiari E, Galvão L. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Research.* 2002; 88: 894-900.

Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto FL. Evaluation of Enzyme Immunoassay Technique for Detection of Antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41: 250-53.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Primary and secondary syphilis – United States, 1997. *Morbidity Mortal Wkly Rep.* 1998a; 24: 493-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsheet_chagas_disease.htm, Division of Parasitic Diseases, Chagas Disease 2006.

Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion *in vitro* recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 60: 303-312.

Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG Antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and leishmania antigens sera of patients with Chagas's disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 650-6.

Chumpitazi BFF, Lepers JP, Simon J, Deloron P. IgG1 and IgG2 antibody responses to *Plasmodium falciparum* correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996; 14: 151-158.

Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*, Atheneu, 1999.

Contreras CE, Pance A, Marcano N, González N, Bianco N. Detection of Specific Antibodies to *Plasmodium falciparum* in Blood Bank Donors from Malaria – Endemic and Non – Endemic Areas of Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 948-53.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002; 18:171-6.

Courtioux B, Bisser S, Belesso PM, Ngoungou E, Girard M, Nangouma A, Josenando T, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B. Dot Enzyme-linked immunosorbent assay for more reliable staging of patients with human African trypanosomiasis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4789-95.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉, expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2001; 20: 385-96.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2002; 20: 385-396.

Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, Davi PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 4030-4034.

Dodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, Akanmori BD, Nkrumah FK, Hviid L. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 1999; 67: 2131-2137.

Donohue J, Bailey M, Gray R, et al. Enzyme Immunoassay system for panel testing. *Clin Chem.* 1989; 35: 1874-7.

Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Suvouttho S. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnosis of human parastrongyliasis. *J Helminthol*. 2004; 78: 287-91.

Ekins R, Chu F, Biggart E. Fluorescence spectroscopy and its application to a new generation of high sensitivity, multi-microspot, multianalyte, immunoassay. *Clin Chim Acta*. 1990; 184: 91-114.

Espinosa AM, Sierra AY, Barrero CA, Cepeda LA, Cantor EM, Lombo TB, Guzmán F, Avila SJ, Patarroyo MA. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine*. 2003; 21: 1033-1043.

Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42 (2): 636-38.

Ferreira MU, Santos-Neto LL, Ferrari JO, Villalobos JM., Carvalho ME. The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum*, in relation to malaria exposure and severity. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1998; 92: 245-256.

Frade AF (2005) Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da doença de Chagas, em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5 anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil. São Paulo (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

Fulton RJ, Mcdade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. *Clin Chem*. 1997; 43: 1749-56.

Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade ALSS. PCR Assay for Monitoring *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Childhood after Specific Chemotherapy. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(11): 5066–70

Goh BT. Syphilis in adults. *Sex Transm Infect*. 2005; 81: 448-52.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MD, Ferreira AG, Silvia ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96 (4): 497-501.

Gomes MLG, Lucia MC, Galvão L, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas' disease Diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(2): 205–10.

Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol.* 2005; 21 (1): 29-34.

Gordon RF, McDade RL. Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FLOWMETRIX™ system. *Clin Chem.* 1997; 43: 1799-801.

Hagedorn HJ, Hagedorn AK, Bosschere KD, Hulstaert F, Pottel H, Zrein M. Evaluation of INNO-LIA Syphilis Assay as a Confirmatory Test for Syphilis. *American Society for Microbiology.* 2002; 40(3): 973–78.

Hall, R., McBride J., Morgan G., Tait A., Zolg J. W., Walliker D., Scaife J. Antigens of the erythrocyte stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* detected by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7: 247-65, 1983.

Hirunpetcharat C, Tian J-H, Kaslow DC, van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky JA, Miller LH, Good MF. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton Carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4⁺ cells. *J Immunol.* 1997; 159: 3400-3411.

Holder AA, Guevara Patino JA, Uthairipibull C, Syed SE, Ling IT, Scott-Finnigan T, Blackman MJ. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parasitologia.* 1999; 41: 409-414.

Holder AA, Sandhu JS, Hillman Y, Davey LS, Nicholls SC, Cooper H, Lockyer MJ. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 1987; 94: 199-208.

Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy.* 1988; 41: 72-97.

Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Nagasse T. A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1978; 20: 208-12.

Ianni BM, Mady C. Como era gostoso o meu caldo de cana... *Arq. Bras. Cardiol.* 2005; 85: 379-81.

Institut Pasteur, P. *Trypanosoma cruzi* à L' Institut Pasteur de Paris <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/index.html> .

Jarude R, Trindade R, Tavares-Neto J. Malaria in pregnant women of a public maternity of Rio Branco (Acre State, Brazil). *Rev Bras Gineco. Obstet.* 2003; 25 (3): 149-54.

Kakabakos SE, Christopoulos TK, Diamandis EP. Multianalyte immunoassay based on spatially distinct fluorescent areas quantified by laser-excited solid - phase time-resolved fluorometry. *Clin Chem.* 1992; 38: 338-42.

Kanunfre KA (2003) Desempenho de metodologia molecular no diagnóstico da malária em amostras de sangue de indivíduos de área endêmica do Brasil. São Paulo (Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Experimental – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

Karunaweera ND. , Wijesekera SK. , Wanasekera D., Mendis KN; Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 19: 188-193, 2003.

Kelly JM. A B-cell activator in Chagas disease. *Nature Medicine.* 2000; 6: 865-866.

Kim S, Ahn H-J, Kim T-S, Nam HW. ELISA detection of vivax malaria with recombinant multiple stage-specific antigens and its applications to survey of residents in endemic areas. *Korean J Parasitol.* 2003; 41 (4): 203-207.

Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sanguinis.* 2006; 90: 77-84.

Korenromp E. Malaria incidence estimates at country level for the year 2004 – Proposed estimates and draft report – *World Health Organization, Roll Back Malaria.* 2004.

Kricka L. Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. *Clin Chem.* 1994; 40: 347-57.

Kricka, L. Multianalyte testing. *Clin Chem.* 1992; 38: 327-8.

Kurstak, E. Enzyme Immunodiagnosis. Orlando, Academic Press, 1986.

Lago EG, Garcia PCR. Congenital syphilis: an emergent emergency also in Brazil. *J Pediatr.* 2000; 6:461-465.

Larsen AS, Hambie EA, Wobig GH, Kennedy EJ. Cerebrospinal fluid serologic tests for syphilis: treponemal and nontreponemal tests. In: Morriset R, Kurstak E (eds). *Advances in Sexually Transmitted Diseases.* VNU Science Press, Utrecht, The Netherlands, 1985: 157-162.

Larsen SA, Farshy CE, Pender B, Adams, MR, Pettit DE, Hambie AD. Staining intensities in the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test: Association with the diagnosis of syphilis. *Sex Transm Dis.* 1986; 13: 221-7.

Larsen SA, Steiner BM, Rudolph A H. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Microbiol. Reviews.* 1995; 8: 1-21.

Lemos E.A. (2002) Padronização e aplicação do teste de western blotting no diagnóstico da sífilis adquirida e congênita e definição de perfis sorológicos (Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Experimental – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). São Paulo.

Lim KJ, Park J W, Yeom JS, Yoo SB, Oh JH, Sohn MJ, Bahk YY, Kim YS. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res.* 2004; 92:384-389.

Lissaldo AM, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES, Stolf AMS. Alkaline soluble *Typanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to dot-ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1994; 36: 163-6.

Little JW. Syphilis: An Update. Medical Management Update. *In: Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2005;100, No 1.

Luitgards-Moura JF, Borges-Pereira J, Costa J, Zauza PL, Rosa-Freitas MG. Sobre a possibilidade da ocorrência de doença de Chagas autóctone em Roraima, Amazônia brasileira, 2000-2001. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2005; 47(1): 45-54.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.

Luitgards-Moura JF, Borges-Pereira J, Costa J, Zauza PL, Rosa-Freitas MG. Sobre a possibilidade da ocorrência de doença de Chagas autóctone em Roraima, Amazônia brasileira, 2000-2001. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2005; 47(1): 45-54.

Luquetti AO, Oliveira RA, Tavares SBN, Oliveira EC, Melo L. Diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudo comparativo em 1.811 soros entre os testes convencionais e os teste de aglutinação de partículas sensibilizadas com peptídeos sintéticos (PaGia). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33 (Supl. I): 104.

Machado RLD, Garret DO, Adagu IS, Warhurst DC, Póvoa, MM. Simplified Diagnosis of Malaria Infection: GFM/PCR/ELISA a Simplified Nucleic Acid Amplification Techinique by PCR/ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1998; 40: 333-338.

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

Marangoni A, Sambri V, Storni E, D'Antuono A, Negosanti M, Cevenini R. *Treponema pallidum* Surface Immunofluorescence Assay for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7: 417-21.

Marangoni, A, Sambri, V, Accardo, S, Cavrini, F, D'Antuono, A, Moroni, A, Storni, E, Cevenini, R. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a Novel Recombinant Antigen-Based Chemiluminescence Immunoassay for Laboratory Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2005, 12: 1231-4.

Marcon GEB, Costa SCB. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2002; 43:39-43.

McDade RL, Fulton RJ. True Multiplexed Analysis by Computer-Enhanced Flow Citometry. *Med Dev & Diagn Ind.* 1997. Disponível em <http://www.devicelink.com/mddi>

Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2001; 64: 97-106.

Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Cristina MD, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen Microarrays for Serodiagnosis of Infectious Diseases. *Clin. Chem.* 2002; 48: 121-30.

Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 59: 1-14.

Moody A. Rapid Diagnostic Test for Parasites. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002; 15 (1): 66-78.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettly AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res* published online 10.1007/s00436-005-1314-x, 2005.

Morel CM, Lazdins J. Focus: Chagas disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2003; 1: 14-5.

Mount A, Mwapasa V, Elliott S, Beeson J, Tadesse E, Lema V, Molyneux M, Meshnick S, Rogerson S. Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *The Lancet*. 2004; 363:1860-67.

Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med and Intern Health*. 2003; 8:(10): 876–83

Nakasaca M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Sousa WV, Barros MNDS, Abath FGC, Gomes YM. Excretory-Secretory Antigen of *Trypanosoma cruzi* Are Potentially Useful for Serodiagnosis of Chronic Chagas' Disease. *Clin and Diagn Laborat Immunol*. 2001; 8(5): 1024-27.

Neto VA, De Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW. Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(6):534-35.

Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Silva LHP, Camargo EP, Del Portillo HA. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2006; 74 (5): 2726-2733.

Norris SJ. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. *Microbiol Rev*. 1993; 57: 750-79.

Noya O, Alarcon de Noya B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Lett*. 1998; 63: 53-6.

Nwuba RI, Sodeinde O, Anumudu CI, Omosun YO, Odaibo AB, Holder AA, Nwagwu M. The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies. *Am Soc Microbiol*. 2002; 70: 5328-5331.

Okech BA, Corran PH, Todd J, Joynson-Hicks A, Uthaipibull C, Egwang TG, Holder AA, Riley EM. Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, PfMSP-119, predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. *Am Soc Microbiol.* 2004; 72: 1557-1567.

Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of FlowMetrix™ system. *Clin. Chem.* 1998; 44: 2057-60.

OMS 2000 - World Health Organization. WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

OMS 2003 – World Health Report 2003: Shaping the future. Disponível em:<http://ibm.who.int>

OMS 2005 – World Malaria Report 2005 – Roll Back Malaria – Disponível em:<http://ibm.who.int>

Oprandy JJ, Long GW. Processing and microfiltration of mosquitoes for malaria antigen detection in a rapid dot immunobinding assay. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1701-3.

Pappas MG. Dot enzyme-linked immunosorbent assays. *In: Collins WP. Complementary immunoassays.* Chichester, UK: Wiley, 1998, p. 113-34.

Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Che KW. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diag Lab Immunol.* 2001; 8: 14-20.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 1214-19.

Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, Spiegel A, Garraud O. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes and Infection.* 2002; 4: 31-5.

Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública.* 2003; 37: 107-15.

Price CP. Microarrays: The Reincarnation of Multiplexing in Laboratory Medicine, But Now More Relevant? *Clin. Chem.* 2001; 47: 1345-6.

Rai GP, Zachariah K, Sharma R, Phadake S, Belapurkar KM. Development of a sandwich dot-enzyme linked immunosorbent assay for *Streptococcus pneumoniae* antigen detection in cerebrospinal fluid. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 217-23.

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, Shonfeld HJ, Holder AA, Greenwood BM. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 1992; 14: 321-337.

Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-I. *Malaria Journal.* 2003; 2: 39.

Rodrigues CS, Guimarães MDC, Grupo Nacional de estudo sobre sífilis congênita. Syphilis positivity in puerperal women: still a challenge in Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2004; 16: 168-75.

Rotta O. Serological Diagnosis of syphilis. *An Bras Dermatol.* 2005; 80(3): 299-302.

Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kilodalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2004; 72 (10): 5775-5782.

Sambri V, Marangoni A, Eyer C, Reichhuber C, Soutschek E, Negosanti M, D'Antuono A, Cevenini R. Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8: 534-9.

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. *Archives of Medical Research.* 2001; 32: 382-8.

Sato NS, Melo CS, Zerbini LCMS, Silveira EPR, Fagundes LJ, Ueda M. Avaliação do teste rápido para a detecção de anticorpos anti-*Treponema pallidum* baseado na técnica de imunocromatografia. *Rev Inst Med trop SP.* 2003; 45: 319-22

Sato NS, Suzuki T, Ueda T, Watanabe K, Hirata RDC, Hirata MH. Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37: 949-55.

Siavashi MR, Taherkhani H, Rezaei K, Deligani MRR, Assmar M. Comparison of Dot-ELISA and sandwich ELISA diagnostic tests in detection of human hydatidosis. *Iran Biomed J.* 2005; 9: 91-4.

Singh AE, Romanowski B. Syphilis: Review with emphasis on Clinical, Epidemiologic, and some biologic features. *Clin. Microbiol.* 1999; 2: 187-209.

Smith PL, Wakerpeach CR, Fulton JR, Dubois DB. A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. *Clin Chem.* 1998; 44: 2054-6.

Snow RW, Molyneux CS, Warn PA, Omumbo J, Nevill CG, Gupta S, Marsh K. Infant parasite rates and immunoglobulin M seroprevalence as a measure of exposure to *Plasmodium falciparum* during a randomized controlled trial of insecticide-treated bed nets on the Kenyan Coast. *Amer J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 144-9.

Soares IS, Rodrigues MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitology.* 2002; 124: 237-246.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portilho HA, Rodrigues MM. Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N-and C-terminal regions of *P. vivax* MSP1. *Am J Trop Med Hyg.* 1999a; 60: 357-63.

Soares IS, Levitus G, Souza GM, Del Portilho HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *P. vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun.* 1997; 65: 1606-14.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N-and C-terminal regions of the merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *Plasmodium vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999b; 72: 13-24.

Speers DJ, Ryan S, Harnett G, Chidlow G. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. *Intern Med J.* 2003; 33: 613-15.

Sutanto I, Pribadi W, Muljono R, Sutanto L, Sutjahjono R, Astuti H, Rasidi R. Seroepidemiological studies of malaria in different endemic areas of Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1992; 23: 563-9.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976; 193: 673-5.

Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, Silveira JF. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 1554-60.

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

Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2001; 39: 169-76.

Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Gruber A, Pereira-Chiocolla VL, Zingales B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas' disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996b; 91:87-93.

Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henríquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, 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.

Vargas AP, Carod-Artal FJ, Del Negro MC, Rodrigues MPC. Demência por Neurosífilis. *Arq Neuropsiquiatrica* 2000; 58: 578-82.

Velásquez EL, Thors RC, Chinchilla MM, Linder E. Autoantibodies give false reaction in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1993; 87: 35.

Wheeler HL, Agarwal S, Goh BT. Dark ground microscopy and treponemal serological tests in the diagnosis of early syphilis. *Sex Transm Infect*. 2004; 80:411-4.

Young H, Walker PJ, Merry D, Soufflet L. A preliminary evaluation of prototype Western blot confirmatory test for syphilis. *Int J STD AIDS*. 1994; 5: 409-14.

Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malaria Journal*. 2002; 1 (2).

Zrein M, Maure I, Boursier F, Soufflet L. Recombinant Antigen – Based Enzyme Immunoassay for Screening of *Treponema pallidum* Antibodies in Blood Bank Routine. *J Clin Microb*. 1995; 33: 525-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)