

Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

Anelise Bergmann Araújo

Doença de Chagas:
Investigação das transmissões transfusional e
congenita e
Avaliação de técnicas sorológicas

Pelotas, 2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANELISE BERGMANN ARAÚJO

**DOENÇA DE CHAGAS:
INVESTIGAÇÃO DAS TRANSMISSÕES TRANSFUSIONAL E CONGÊNITA E
AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Élvia Elena Silveira Vianna
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2006.

Banca examinadora:

Dra. Adriana Lima Vallochi

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Dr. Odir Antônio Dellagostin

Dra. Élvia Elena Silveira Vianna (Orientadora)

Dra. Maria Elisabeth Aires Berne (Co-Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, inicio e centralizo meus agradecimentos a Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, pelas bênçãos diárias, pela capacidade intelectual e pela sua constante e marcante presença em tudo que faço e muito especialmente por todas as pessoas que coloca no meu caminho, dentre as quais destacarei neste momento, algumas que mais participaram desta conquista:

À minha amada família, meu suporte, companheiros de toda a vida e de cada dia, de forma imensamente especial à minha incansável mãe, minha cúmplice, pelo exemplo de vida, de postura profissional, pela presença constante, pelo apoio psicológico e prático, pelo incentivo, por tentar aliviar o meu cansaço, mesmo que o dela fosse ainda maior. Aos meus avós, tão amorosos e dedicados, que várias vezes reclamaram minha ausência pelos envolvimento nas atividades do curso de mestrado. Também sempre muito presentes na minha vida, pelos meus dindos Neuza e Toninho e minhas primas e irmãs Bebele, Nanaia e Cíntia.

À minha orientadora Élvia por ter acreditado em mim desde o início e pelo apoio e ajuda sempre que necessário.

À minha co-orientadora que esteve comigo desde o início da minha carreira como parasitologista, ela que sempre me contagiou com sua paixão pela profissão e pela pesquisa, mas muito mais que isso, tornou-se uma grande amiga, companheira, conselheira e, com certeza, com licença da minha mãe biológica, também posso considerá-la como uma mãe. Obrigada pela orientação constante e pelos momentos que vivemos até agora.

Aos professores do curso de Pós-Graduação, pelos seus conhecimentos e experiências transmitidas.

Às minhas colegas, mais que isso, amigas do Hemocentro Regional de Pelotas, meu local de trabalho, Clarissa, Francine, Gilca, Jalusa e Luciana, e também à larema, que lá conheci, pessoas com quem passei grande parte do meu tempo neste período, pelo convívio diário, apoio, força, estímulo, pelas conversas e muito

mais, que não tem como descrever, mas também pela contribuição no trabalho e por estarem sempre disponíveis em me ajudar direta ou indiretamente nas vezes em que precisei me ausentar do meu trabalho para atividades do mestrado.

Às grandes amigas do meu grupo de Emaús, Romanos 5, pelo companheirismo, por suas amizades que me fazem tão feliz, pela compreensão nas minhas ausências, pelo carinho, pelo estímulo, enfim, no mínimo por estarem na minha vida e me fazerem sentir tão amada.

Com um carinho especial, à Anna Cristina, com sua presença e incentivo constantes nos dias (e madrugadas) de trabalho, mas muito mais que isso, pela boa vontade e amor com que colaborou na montagem gráfica desta dissertação, trabalhando, literalmente, ao meu lado.

A outros amigos que não teria como citar neste momento, que também fazem parte da minha vida e, mesmo que indiretamente, estão incluídos neste processo.

Aos meus colegas de mestrado tão “inspeciais” (Cristiane, Denise, Hermann, Michele, Ricardo e Tiago), não podendo deixar de destacar o Ricardo Falchi, originalmente meu mestre em parasitologia e, agora, pelas felizes surpresas da vida, colega de profissão e de aula e à colega Michele Pepe, em quem descobri uma grande amiga neste período.

Aos colegas e amigos que convivi no Laboratório de Parasitologia (DEMP/IB/UFPel): Alice, Ana Paula, Cristina, Dani, Elizandra, Fernanda, Jozi, Neila, Rafão e Ritoca.

Às distribuidoras de produtos diagnósticos Sullab e Alka, pela doação de material de pesquisa.

Ao Laboratório Central de Diagnóstico (LACEN/FEPPS/POA), mais especificamente na pessoa da Cloé, pela cedência de material de análise para o trabalho.

À prof^a. Eufrosina Umezawa, pela atenção e receptividade com que me tratou desde o primeiro contato e, posteriormente, por contribuir com material para enriquecer minha pesquisa, além de um gentil auxílio técnico.

Ao Hemocentro Regional de Pelotas por disponibilizar suas dependências, material de análise e dados para realização de grande parte deste trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia da UFPel, nos laboratório dos Profs. Odir Dellagostin, José Antônio Guimarães Aleixo e Carlos Turnes Gil, pelo empréstimo de equipamentos

Ao prof. Paulo Post pela prontidão e gentileza na cedência de seu laboratório para uso do microscópio de imunofluorescência, o que viabilizou a execução de certa parte deste trabalho.

Enfim, sei que não conseguirei ser justa ao agradecer num único momento, e em poucas palavras, o muito que recebi durante estes dois anos. O que posso afirmar é que tudo que construí durante este tempo só foi possível pela presença de muitas pessoas especiais e importantes na minha vida.

Obrigada!

RESUMO

ARAÚJO, Anelise Bergmann. **Doença de Chagas: Investigação das transmissões transfusional e congênita e Avaliação de técnicas sorológicas.** 2006. 142f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Embora há muito descrita pelo pesquisador Carlos Chagas (1909), a doença que leva seu nome, ou também conhecida como Tripanossomose Americana, ainda representa um desafio para a saúde pública pelos índices de morbidade e mortalidade que apresenta. O agente causador é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que acarreta um quadro clínico bastante variável, dependente de como se desenvolve a doença no hospedeiro. Na fase aguda o hospedeiro pode apresentar-se com febre, linfadenite, apatia, cefaléia, edemas e hepatoesplenomegalia, além de marcas de penetração do parasito, como chagoma de inoculação e edema bipalpebral unilateral. O parasito, porém, pode permanecer alojado em diversos tecidos por vários anos, caracterizando o quadro crônico, especialmente com lesões cardíacas e no aparelho digestório. A transmissão poderá ser via vetor, insetos triatomíneos, ou por outras vias como transfusão sangüínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, transmissão oral ou acidentes de laboratório. O diagnóstico da Doença de Chagas engloba métodos parasitológicos, com pesquisa do próprio agente, e métodos sorológicos, pela pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. No intuito de aprofundar questões referentes à esta doença, foi desenvolvido o presente estudo, focando três objetivos principais: investigar a sororreatividade para *T. cruzi* em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas (Hemopel); avaliar a possibilidade de transmissão congênita por *T. cruzi* na região de Pelotas e verificar a concordância entre o sorodiagnóstico da Doença de Chagas por imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, três kits de ELISA e TESA-Blot. Para isso foram avaliadas amostras de doadores de sangue do Hemopel durante o período de 2004-2005, amostras de soro de cordão umbilical e, para avaliação do diagnóstico sorológico, foram comparados três ELISAs, hemagutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI), frente a um painel de amostras com reatividade de algumas destas técnicas para pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*. Das 4482 amostras analisadas do Hemopel, 0,96% apresentaram reatividade e 0,47% foram

positivas para *T. cruzi*, sendo que estes desconhecem que são portadores da doença. A Doença de Chagas apareceu como a segunda causa de descarte de bolsas de sangue no Hemopel no período de 2004-2005 e a maior frequência de casos positivos ocorreu em mulheres, indivíduos com baixa escolaridade e naturais do município de Canguçu, RS. Na análise de soros de cordão umbilical, das 351 amostras, apenas uma mostrou-se positiva, não havendo sido, em princípio, detectada a transmissão da doença para o feto. Na comparação das técnicas sorológicas, foi verificada co-positividade entre os ELISAs, HAI e IFI em 106 (65,84%) amostras e nas demais, 55 (34,16%), houve discordância em pelo menos uma das técnicas. Pelos resultados obtidos, embora não hajam casos relatados, observa-se que há possibilidade de transmissão transfusional e congênita nas populações estudadas, tendo em vista que foram detectados doadores e gestantes soropositivos, sendo necessária atenção ao controle da transmissão da Doença de Chagas por via não vetorial. Com relação ao sorodiagnóstico, a discordância entre resultados das diferentes técnicas demonstra a necessidade de associar mais de uma técnica para o diagnóstico da Doença de Chagas, especialmente com o intuito de resolver resultados inconclusivos. Por fim, cabe salientar a necessidade de maior atenção a esta doença, a qual permanece presente em diversos casos nesta região.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Transmissão transfusional. Transmissão congênita. Diagnóstico sorológico.

ABSTRACT

ARAÚJO, Anelise Bergmann. **Chagas Disease: Investigation of transfusional and congenital transmission pathways and Serological techniques evaluation.** 2006. 142f. Dissertation (Master degree in Parasitology) – Microbiology and Parasitology Department, Biology Institute, Federal University of Pelotas.

Chagas disease was described by the researcher Carlos Chagas in 1909, however this disease, also known as American trypanosomiasis, still represents a challenge to public health, by the morbidity and mortality levels of the infected individuals. The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the agent of this disease, the development of the disease by the host, leads to different clinical symptoms. In the acute phase the host could show fever, lymphadenitis, apathy, headache, edema and enlargement of the liver and spleen, also showing the entry marks from the parasite like inoculation Chagoma and unilateral bipalpebral edema. The parasite, however, could remain hosted in several tissues by years, which characterize the chronic state, specially causing cardiac and gastrointestinal tract lesions. The vector, triatomine insects, blood transfusion, congenital transmission, organ transplant, oral transmission or laboratorial accidents represent the pathways of transmission. The Chagas disease diagnosis consists in parasitological methods, by the search for the agent, and serological techniques, by the search for antibodies anti-*T.cruzi* in the serum. The present study was developed with the objective of providing more information about this disease, the three major aims were: to investigate the serum reactivity to *T.cruzi* in blood donors at the Regional Hemocenter of Pelotas (Hemopel), to evaluate the possibility of congenital transmission by *T.cruzi* in the Pelotas region and to verify the results obtained by different techniques including Indirect Immunofluorescence (IIF), Indirect Hemoagglutination (IH), three ELISA kits and TESA-Blot. A total of 4.482 blood samples of donors from the Hemopel during the years of 2004-2005 and 351 umbilical cord serum were evaluated by ELISA and, for the evaluation of serological diagnosis, three ELISA kits, Indirect hemoagglutination and Indirect Immunofluorescence were compared against a sample panel which shows reactivity for these techniques to research the presence of antibodies anti-*T.cruzi*. The results found were 0,96% of reactivity to *T.cruzi* and 0,47% were concluded as positives, from the 4.482 analyzed samples. In the umbilical cord

analysis one was considered positive and in this case the congenital pathway was not detected. In the comparison of the serological techniques, co-positivity was verified between the ELISA kits, IH and IIF in 106 samples (65,84%) in 55 samples (34,16%) were discordance at list in one technique. Cases of transfusional and congenital transmission where not reported, however our results indicate the real possibility of these transmissions in the studied population, we found donors and pregnant women detected as serumpositives. In relation to the serumdiagnosis the disagreements between the results of these different techniques demonstrate the necessity of association of more than one technique to realize the Chagas disease diagnosis, especially with the intention of to clear inconclusive results. This study revel the necessities of attention to this disease, which one continue to perform patients in this region.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Transfusional transmission.
Congenital transmission. Serological diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figura 1	Porcentagem de amostras de sangue reativas para <i>T. cruzi</i> pela técnica de ELISA Chagatest utilizada no teste de triagem de rotina entre os doadores do Hemopel no período de 2004-2005.....	53
Figura 2	Valores das densidades ótica obtidas na leitura do ELISA Chagatest na pesquisa de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> das amostras de doadores que apresentaram reatividade na triagem sorológica	54
Figura 3	Número de amostras reativas para <i>T. cruzi</i> nas diferentes técnicas sorológicas a partir das amostras com reatividade inicial na triagem sorológica dos doadores de sangue do Hemopel 2004-2005	56
Figura 4	TESA-Blot de 23 das 43 amostras de soro previamente reativas na triagem usando ELISA Chagatest.....	57
Figura 5	Situação dos doadores que apresentaram reatividade inicial na triagem em relação à coleta de 2ª amostra, realizado pelo ELISA Chagatest	58
Figura 6	Porcentagem de descarte de bolsas por bloqueio sorológico por diferentes agentes infecciosos na triagem sorológica do Hemopel, no período de 2004-2005.....	61
Figura 7	Número de amostras reativas e positivas para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> em doadores do Hemopel no período de 2004-2005.....	62

ARTIGO 2

Figura 1	Logaritmo dos valores de densidade ótica obtidos na leitura do ELISA na pesquisa de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostras de soro de cordão umbilical.....	85
Figura 2	Padrão de pesos moleculares reconhecidos pelos anticorpos da mãe e criança no TESA-Blot	86

ARTIGO 3

Figura 1	DO obtida nas três técnicas de ELISA utilizadas na análise das 161 amostras selecionadas por apresentarem reatividade em alguma técnica de triagem para Doença de Chagas.....	112
Figura 2	Padrão apresentado por soros R e NR para anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> na IFI.....	114
Figura 3	Reatividade para anti- <i>T. cruzi</i> de amostras de soro analisadas pela HAI.....	115
Figura 4	Padrão de bandas do antígeno de excreção e secreção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> reconhecidos no <i>imunoblot</i> de 15 das 106 amostras reagentes em todas as técnicas sorológicas realizadas.....	116
Figura 5	TESA-Blot de 8 das 21 amostras reagentes em apenas um dos ELISAs.....	117
Figura 6	TESA-Blot das 10 amostras reagentes em apenas dois ELISAs.....	118
Figura 7	TESA-Blot das 6 amostras reagentes nos ELISAs e não reagentes na HAI e IFI (grupo 11100).....	119
Figura 8	Padrão de bandas do antígeno de excreção e secreção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> reconhecidos no <i>imunoblot</i> das 10 amostras reagentes nos não reagentes apenas na IFI	120
Figura 9	TESA-Blot de amostras não reagentes em apenas uma técnica.....	120

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Resultado obtido nos diversos métodos sorológicos das amostras que apresentaram reatividade na triagem sorológica e da nova coleta de doadores do Hemopel.....	55
Tabela 2	Perfil dos doadores do Hemopel quanto à idade e sexo em 2004-2005.....	60

ARTIGO 2

Tabela 1	Reatividade do soro de gestante positiva para anti- <i>T. cruzi</i> e sua criança em diferentes técnicas sorológicas.....	86
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ARTIGO 3

Tabela 1	Freqüência e porcentagem do padrão sorológico apresentado por 161 amostras de soros analisados por um painel de técnicas sorológicas.....	110
----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS GERAIS	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. O Agente Etiológico	19
3.2. O Vetor	20
3.3. Formas de Transmissão	23
3.4. A Doença	27
3.5. Diagnóstico	30
ARTIGO 1 – Detecção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas, RS, Brasil	
Resumo	35
Abstract	36
Introdução	37
Objetivos	42
Material e Métodos	43
Resultados e Discussão	53
Conclusões	65
Referências	66
ARTIGO 2 – Investigação da Doença de Chagas na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil	
Resumo	77
Abstract	73
Introdução	74
Objetivos	77
Material e Métodos	78
Resultados e Discussão	85
Conclusões	89
Referências	90

ARTIGO 3 – Avaliação de três ELISAs, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e TESA-Blot no sorodiagnóstico da Doença de Chagas

Resumo	93
Abstract	95
Introdução	97
Objetivos	102
Material e Métodos	103
Resultados e Discussão	110
Conclusões	123
Referências	124
CONCLUSÕES GERAIS	129
REFERÊNCIAS GERAIS	130
ANEXOS	141

INTRODUÇÃO

Há muito descrita pelo pesquisador Carlos Justiniano Chagas (1909), a doença que leva seu nome, ou também conhecida como Tripanossomíase Americana, devido a sua distribuição geográfica, ainda representa um problema de saúde pública no Brasil.

O indivíduo infectado por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, poderá desenvolver doença aguda com sinal de Romaña, chagoma de inoculação, linfadenite, febre, edema e hepatoesplenomegalia. Porém, é comum permanecer assintomático e apresentar sintomas da doença muitos anos depois, caracterizando a fase crônica, com alterações cardíacas, digestórias e/ou nervosas.

A preocupação com a Doença de Chagas justifica-se por vários motivos. O indivíduo chagásico na maioria dos casos permanece infectado pelo resto de sua vida, por ineficácia no tratamento, e pode desenvolver um quadro clínico crônico, que, com a progressão da doença, causa debilidade do paciente, impossibilitando-o de realizar diversas atividades, podendo inclusive levar à morte. A doença crônica, especialmente a sintomatologia cardíaca, além de limitar em muitos aspectos a realização de algumas tarefas, poderá excluí-lo socialmente, como no caso de veto em certos vínculos empregatícios. Além disso, estes pacientes doentes são fontes constantes de infecção, mantendo a doença em determinadas regiões.

Essa, como tantas outras parasitoses, em geral, recebem pouca atenção e não são levadas a sério como um problema em potencial para a população. Embora sejam reconhecidas algumas áreas do Rio Grande do Sul como endêmicas, tenha-se registro de elevado número de casos crônicos da doença, conheça-se os relatos de captura dos vetores e existam as condições epidemiológicas favoráveis para manter esta zoonose, pouco se tem estudado a respeito da real situação da doença neste estado. Pesquisa epidemiológica desenvolvida por Baruffa e Alcântara Filho (1985) relatou a positividade na reação de fixação do complemento para *T. cruzi* em 19,6%

de 6.983 amostras de sangue de populações rurais de 178 municípios da região sul do Rio Grande do Sul, colocando esta área entre as de maior endemia do Brasil.

Naturalmente a transmissão de *T. cruzi* para o homem ocorre via vetor. Entretanto, com a implantação de programas de controle do vetor, houve redução nos casos de doença de Chagas no Brasil por esta via. Devido a isto, a transmissão transfusional e, com menor ênfase, a congênita, tornaram-se importantes formas de transmissão deste protozoário.

Outro fator importante foi o êxodo rural, já que a Doença de Chagas tratava-se de uma endemia rural e a migração de indivíduos para os centros urbanos, sendo estes muitas vezes doadores de sangue, levou à disseminação desta doença para as cidades. Isto resultou na necessidade em implantar um controle de triagem permanente entre os doadores de sangue, através de entrevista dos candidatos e triagens sorológicas.

A respeito disso, um melhor conhecimento das características das técnicas sorológicas utilizadas em triagens sangüíneas e diagnóstico da Doença de Chagas se faz necessário para que se possa utilizá-las e interpretá-las corretamente, principalmente em casos indeterminados e inconclusivos, além de associar a diversos fatores epidemiológicos para chegar-se a um diagnóstico conclusivo.

Desta forma, pelo descrito, é inegável a importância de estudos envolvendo a Doença de Chagas, que, inclusive, ora ou outra surpreende a população com surtos, incluindo relatos fatais, como ocorrido no estado vizinho de Santa Catarina no ano passado (SES/SC, 2005).

OBJETIVOS GERAIS

- Investigar a sororreatividade para *T. cruzi* em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas.
- Avaliar a possibilidade de transmissão congênita por *T. cruzi* na região de Pelotas.
- Verificar a concordância entre o sorodiagnóstico da Doença de Chagas pelas técnicas imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, três *kits* de ELISA e TESA-Blot.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Agente Etiológico

Trata-se de um protozoário flagelado, Filo Sarcomastigophora, Sub-Filo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. *Trypanosoma cruzi* é a espécie representante desta família capaz de causar a Doença de Chagas no homem. Apresenta-se sob três formas durante o seu ciclo: amastigota, epimastigota e tripomastigota. A forma amastigota, encontrada no interior de células de hospedeiros vertebrados, é arredondada e com capacidade de multiplicação por divisão binária. A outra forma encontrada no hospedeiro vertebrado, eliminada pelo invertebrado, é a tripomastigota, sendo esta alongada, extracelular, com ampla membrana ondulante e um flagelo exteriorizado, sendo a forma infectante, tanto para o homem quanto para o vetor da doença. Já no interior do hospedeiro invertebrado, observa-se uma forma alongada, com pequena membrana ondulante e um flagelo exteriorizado, denominada epimastigota, a qual multiplica-se por divisão binária no estômago desses hospedeiros (BRENER e ANDRADE, 1979; ARAÚJO-JORGE, 1999; SOUSA, 1999).

A análise do seqüenciamento genético de *T. cruzi* prevê que este contenha 22.570 proteínas codificadas pelos genes representados em 12.570 pares de alelos (EL-SAYED et al., 2005), apresentando alta heterogeneidade e variabilidade genética entre as cepas, o que acarreta dificuldades no diagnóstico, influencia na diversidade de formas clínicas da doença e determina características bem regionais da Doença de Chagas (MOREL et al., 1980; CARNEIRO et al., 1991; SOUTO et al., 1996; FERNANDES et al., 1997; CAMPOS et al., 1999; RUIZ-GARCIA et al., 2000; AÑEZ et al., 2004). A caracterização de isolados de cepas de *T. cruzi* é descrita em algumas regiões. A análise isoenzimática de 29 cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos no Rio Grande do Sul, de triatomíneos e de *Didelphis* sp. mostrou três diferentes zimodemos distintos presentes no estado, sendo que dois

destes apareciam infectando o homem (FERNANDES et al., 1997). Em 23 chagásicos da Venezuela, 74% mostraram isolados de *T. cruzi* da linhagem filogenética I, enquanto os outros 26%, *T. cruzi* da linhagem filogenética II (AÑEZ et al., 2004). De importância no diagnóstico, Thomas et al. (2001) descreveram epítipo linear da proteína KMP11 como um dos determinantes antigênicos altamente dominante em soros de pacientes chagásicos e com leishmaniose, entretanto, os soros de pacientes chagásicos reconheciam as porções lineares, enquanto os pacientes com leishmaniose visceral, ligavam-se mais diretamente a epítipos com conformações.

3.2 O vetor

Insetos hemípteros hematófagos são considerados vetores da Doença de Chagas (LENT, 1999). Infectam-se com as formas tripomastigotas do sangue circulante dos hospedeiros vertebrados (mamíferos em geral, inclusive o homem) e, após estas multiplicarem-se na forma de epimastigotas no interior do seu aparelho digestório, são eliminadas novamente na forma de tripomastigotas juntamente com fezes e urina do inseto, quando este realiza nova hematofagia. São insetos com 1 a 4cm, alados, de hábitos noturnos e picada indolor. Aparecem no ambiente silvestre, peridomiciliar e domiciliar, especialmente casas características da zona rural, de barro com cobertura de sapê, alvenaria ou madeira, as quais possuem fendas ou frestas que servem de abrigo e esconderijo para o vetor. *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são os gêneros importantes como vetores do *Trypanosoma cruzi*. (BRENER e ANDRADE, 1979)

Estes insetos são bastante conhecidos entre a população do meio rural, identificados por diversos nomes, variando nas diversas localidades onde pode ser encontrado. Além de “barbeiro”, denominação que se acredita ser a mais conhecida, os triatomíneos hematófagos também são conhecidos como “chupão”, “chupança”, “fincão”, “furão”, “bicudo”, “percevejão”, “bicho de parede”, “bicho-de-parede-preto”, “chupa-pinto”, “percevejo-do-sertão”, “percevejo-francês”, “percevejo-gaudério”, “procotó”, “porocotó”, “baratão”, “bruxa”, “cafote”, “cascudo”, “piolho de piaçava”, “quiche do sertão”, “rondão” e “vum-vum” (LENT, 1999).

A denominação de tripanossomiose americana, também utilizada para a Doença de Chagas, deve-se à sua distribuição geográfica exclusivamente nas Américas, a qual relaciona-se à presença dos vetores nesta área, aparecendo desde os Estados Unidos até o sul do Chile e Argentina. Analisando a epidemiologia dos triatomíneos na América do Sul, destacam-se *Triatoma infestans*, *Panstrongyillus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. rubrofasciata* e *Rhodnius prolixus* (LENT, 1999).

Apesar do destaque de certas espécies como vetores principais para a Doença de Chagas na América, muitas outras espécies completam uma vasta disponibilidade de triatomíneos com possibilidade de transmitir o parasito causador desta doença. No período de 1993-1998 foram capturados 4.128 triatomíneos em casa selecionadas de 22 regiões da Guatemala, com identificação de *T. dimidiata* (1.675 exemplares), *R. prolixus* (2.344 exemplares) e *T. nitida* (109 exemplares), com um índice de infecção natural por *T. cruzi* de 20,6%, 19,1% e 13,8%, respectivamente (MONROY et al., 2003).

Em captura realizada em 51 municípios do estado de Jalisco, México, foram coletados 1.029 triatomíneos no domicílio e peridomicílio classificados em oito diferentes espécies, aparecendo infecção por *T. cruzi* em exemplares de cinco destas: *T. barberi*, *T. longipennis*, *T. mazzotti*, *T. pallidipennis* e *T. picturata*. (MAGALLÓN-GASTÉLUM et al., 1998). Em outra pesquisa realizada no México, os insetos vetores encontrados no ambiente doméstico e peridoméstico foram de *T. dimidiata*, *T. barberi* e *Dipetalogaster maxima* (JUARÉZ et al., 2002). Já em Yucatán Península, também no México, o único vetor da Doença de Chagas é *T. dimidiata* (DUMONTEIL et al., 2004).

No norte do Peru é descrita uma variedade de espécies de triatomíneos considerados vetores em potencial para a Doença de Chagas. *R. ecuadoriensis* aparece como um importante vetor doméstico, encontrado largamente e naturalmente infectado por *Trypanosoma*. Em adição a este, aparece *P. herreri*, principal vetor doméstico da área, *T. dimidiata*, *T. carrioni*, *P. chinai*, *P. rufotuberculatus*, *P. geniculatus*, *R. pictipes*, *R. robustus*, além de outras espécies também encontradas nesta região, porém, com pequeno ou nenhum significado epidemiológico (CUBA et al., 2002). *R. ecuadoriensis* também foi encontrado colonizando domicílios rurais do sul do Equador (ABAD-FRANCH et al., 2002).

Em Corrientes, Argentina, foram encontrados triatomíneos em 28,1% dos domicílios pesquisados e em 31,8% dos anexos, principalmente na primavera e verão, sendo *T. sordida*, *Psammolestes coreodes* e *T. infestans*, mas somente esta última no ambiente doméstico (BAR et al., 2002).

No Brasil, segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 1996), 42 espécies foram identificadas até agora, das quais 30 já capturadas no ambiente domiciliar. Em 12 estados das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste durante o período de 1993-1999, foram capturados 1.591.280 triatomíneos em ambientes domiciliares. O maior número de triatomíneos ocorreu no Ceará. Bahia e Minas Gerais apresentaram a maior diversidade de fauna de triatomíneos com 13 e 14 diferentes espécies, respectivamente. De 21 espécies coletadas *T. brasilienses* destacou-se por representar 26,6% do total de triatomíneos, estando infectado naturalmente por *T. cruzi* em níveis variados na maioria dos estados, sendo o maior nível de infecção no Rio Grande do Norte (4,5%) e a média entre todos os estados de 1,3% (COSTA et al., 2003).

Na região centro-oeste de Minas Gerais, foram identificadas, entre os anos de 2000 e 2003, quatro espécies de triatomíneos: *Panstrongylus megistus*, *P. diasi*, *T. sordida* e *R. neglectus*, mas apenas 1,3% dos 752 exemplares examinados estavam positivos para *T. cruzi*, sendo todos *P. megistus*. Esta espécie também destacou-se epidemiologicamente por ser encontrada em maior quantidade, no maior número de municípios e a única a ser detectada no intradomicílio (VILLELA et al., 2005).

Silveira e Vinhaes (1999), comparando dados anteriores e posteriores à campanha de controle de vetores da Doença de Chagas em 1975, relataram que a transmissão por *Triatoma infestans*, no Brasil, está praticamente interrompida e a transmissão por outras espécies nativas de triatomíneos de diferentes regiões é possivelmente muito baixa. Entretanto, estudos evidenciam a captura de outras espécies de triatomíneos, possíveis transmissores do *T. cruzi*. Nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná foram encontrados exemplares de *Triatoma rubrovaria* naturalmente infectados e verificado um aumento da invasão domiciliar e peridomiciliar por este triatomíneo, sendo a espécie mais freqüentemente encontrada após a campanha de controle de *T. infestans* pela FUNASA (ALMEIDA et al., 2000).

Mesmo em condições de laboratório, estudos da biologia de *T. rubrovaria* como viabilidade, condições de reprodução e infectividade por *T. cruzi* apontam esta

espécie de triatomíneo passível de tornar-se importante na transmissão da Doença de Chagas em algumas regiões do sul do país onde vem sendo encontrada (RODRIGUES et al., 2005). Por outro lado, apesar da observação de invasão domiciliar de *T. rubrovaria*, não são relatados indícios de colonização domiciliar e utilização do soro humano como freqüente fonte alimentar (ALMEIDA et al., 2002).

No Rio Grande do Sul, em quatro municípios pesquisados – Santana do Livramento, Canguçu, Santiago e Encruzilhada do Sul – foram coletados 574 triatomíneos das espécies *T. rubrovaria*, *T. circummaculata* e *T. carvalhoi* (apenas um exemplar). A maioria dos triatomíneos foi encontrada nas áreas silvestres e apenas em Canguçu houve a ocorrência peridomiciliar (ALMEIDA et al., 2002).

Onze espécies de triatomíneos já são reconhecidas no estado e, dentre as espécies rupestres (associadas a rochas), *T. rubrovaria* atualmente destaca-se, já que apresenta prevalências maiores para infecção por *T. cruzi*. (RUAS-NETO e CORSEUIL, 2002).

3.3 Formas de Transmissão

3.3.1 Transmissão pelo vetor

O indivíduo infectado por *T. cruzi* apresenta formas tripomastigostas do agente na corrente circulatória, as quais poderão ser ingeridas pelo triatomíneo quando este faz hematofagia no indivíduo. O vetor contaminado permite a multiplicação do agente na forma de epimastigota, que ao chegar no reto do inseto, transforma-se na forma tripomastigota metacíclica. Ao picar um hospedeiro, o inseto ingere sangue, preenchendo seu aparelho digestório e, assim, elimina fezes e urina, sendo que nestas estão presentes formas tripomastigostas do protozoário. As formas tripomastigostas acabam por penetrar na pele do indivíduo, no lugar da picada ou em local lesado, por exemplo, pela coceira, além de mucosas íntegras ou lesadas do hospedeiro, atingindo a corrente circulatória do mesmo. (BRENER e ANDRADE, 1979; GARCIA et al., 1999; STEINDEL, 1999; ZELEDÓN, 1999)

Essa é a forma mais importante de transmissão da doença (DIAS e SCHOFIELD, 1999), podendo ocorrer dentro das casas ou eventualmente quando o homem penetra no ambiente silvestre. Adultos e crianças estão igualmente expostos

ao risco de contaminarem-se desta maneira. Porém por esta forma de transmissão, visto as características epidemiológicas, especialmente de presença do vetor e animais reservatórios, os casos de infecção na zona rural destacam-se nos inquéritos epidemiológicos. Em Berilo, MG, de 2.261 indivíduos analisados de janeiro a julho de 1997, por Montoya et al. (2003), 18% apresentaram reatividade nos testes. Após considerar apenas a população rural maior de 30 anos deste inquérito, foi encontrada uma prevalência de 50%. Também em MG, em Abadia dos Dourados, Machado et al. (1998) demonstraram esta diferença, já que num total de 501 indivíduos testados, 17 (8,4%) eram positivos, sendo 16 da zona rural e apenas um da zona urbana. Analisando os casos sororreativos para a Doença de Chagas em Corrientes, Argentina, foi observado que a maioria das casas destes indivíduos apresentavam colônias de *T. sordida* (BAR et al., 2002).

A infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos capturado ocorre em diversas regiões e apresenta-se bastante variada, considerando a localidade e a espécie do triatomíneo. A infecção por *T. cruzi* em triatomíneos coletados em Corrientes, Argentina, foi de 60% em *T. infestans* e 12,7% em *T. sordida* (BAR et al., 2002). *T. brasiliensis* apresentou-se infectado por *T. cruzi* em níveis variadas em sete de 12 estados do Brasil: 4,5% no Rio Grande do Norte, 4,3% em Alagoas, 2,7% na Bahia e em Pernambuco, 1,6% na Paraíba, 0,8% no Piauí e 0,5% no Ceará (COSTA et al., 2003).

Porém, cabe salientar a redução da transmissão de *T. cruzi* por esta via em função do controle direcionado aos vetores, em especial a campanha implementada pela Fundação Nacional de Saúde (1985-1997), direcionada ao combate em massa aos triatomíneos e melhoria das habitações, a qual gerou resultados positivos (ALMEIDA et al., 2000; SILVEIRA e VINHAES, 1999).

3.3.2 Transfusão sangüínea

Atualmente a hemoterapia tem crescido como forma de tratamento e as campanhas de doação de sangue vêm sendo exaustivamente veiculadas para garantir uma oferta sangüínea suficiente.

As formas tripomastigotas estão circulantes e, caso este sangue seja infundido noutro paciente, estas formas serão transferidas para o receptor do sangue, que estará então contaminado.

Considerando essa forma de transmissão da doença, é obrigatória a realização de triagem sorológica para a Doença de Chagas nos Bancos de Sangue por um exame imunoenzimático de alta sensibilidade (RDC/ANVISA 153/2004). Por esta legislação, atualmente é recomendada apenas uma técnica de triagem sorológica, porém até pouco tempo a obrigatoriedade era de, no mínimo, duas técnicas para esta doença. Dados do MS/ANVISA (2005) relatam a infecção chagásica entre doadores de sangue variando de 3,91 a 10,43% entre os centros, estimando uma ocorrência de 20.000 casos novos/ano por via transfusional nesta mesma época. Em Pelotas, no levantamento realizado por Borges (2004) em doadores do ano de 2003 de um determinado banco de sangue, de 4.741 doadores, 28 (0,56%) foram soropositivos em pelo menos uma das técnicas realizadas (ELISA e hemaglutinação passiva reversa), sendo nove pacientes residentes nesta cidade e o restante proveniente de municípios próximos. Anteriormente, entre 1975 e 1978, a infecção chagásica foi analisada entre os doadores de um outro banco de sangue da cidade de Pelotas por Baruffa (1985). Nesta ocasião, dos 4.134 soros de doadores analisados pela reação do complemento, 166 (4,01%) reagiram positivamente, sendo que, focalizando os doadores da zona rural, a positividade aumenta para 10,65%. No Hemocentro Regional de Iguatu, CE, de 3.232 doadores de 1996-1997, um total de 61 (1,9%) foram soropositivos para a infecção chagásica, onde a técnica de ELISA detectou 49 doadores e a HPR (hemaglutinação passiva reversa) 38, demonstrando, também, que nenhuma destas técnicas mostra-se tão sensível isoladamente (SOBREIRA et al., 2001). Já em Puebla, zona não endêmica do México, Sánchez-Guillén et al. (2002), relataram uma alta soroprevalência, comparada à ocorrência em países endêmicos, pois de 2.140 doadores de área não endêmica, encontraram índices superiores a 8,5%, 9% e 7,7% de positividade para IHA (hemaglutinação indireta), ELISA e para ambos, respectivamente.

3.3.3 Transmissão Congênita

T. cruzi em gestantes infectadas poderá localizar-se na placenta (NISIDA et al., 1999; MORETTI et al., 2005) e atingir a circulação fetal. Embora esta via de transmissão não seja epidemiologicamente a mais importante e não desperte atenção para os cuidados com a Doença de Chagas, a infecção congênita têm aparecido em vários casos de pacientes parasitados por *T. cruzi*. Bonametti et al. (1998) inferiram a possibilidade de infecção congênita em um estudo de soroprevalência de *T. cruzi* em estudantes de Londrina, PR. Em 341 recém-nascidos de mães soropositivas de Santa Fé, Argentina, a incidência de infecção transplacentária foi detectada em 2,64%, ou seja, nove recém-nascidos infectados, podendo ser considerada uma via de transmissão importante em áreas de baixa endemicidade (STREIGER et al., 1995). Rassi et al. (2004), em estudo retrospectivo, observaram dois casos positivos (0,7%) para Doença de Chagas entre 278 filhos de 145 mães com doença crônica. A infecção congênita em duas gerações é descrita por Schenone et al. (2001) no Chile. Na Argentina, houve registro de 102 casos de infecção congênita entre recém-nascidos e lactantes no período de 1980-1997 (ZAINDENBERG, 1999).

Muitas são as conseqüências clínicas da infecção congênita para os recém-nascidos, aparecendo como principal a hepatomegalia (FREIJI e ALTECH, 1995), entre outras, como mal nutrição, megaesôfago e alterações do funcionamento gastrointestinal (BITTENCOURT et al., 1984), anemia, meningoencefalite e miocardite (NISIDA et al., 1999) e, podendo, inclusive, culminar com casos de mortalidade (NISIDA et al., 1999; BLANCO et al., 2000).

3.3.4 Outras formas de transmissão

No estudo epidemiológico da Doença de Chagas, outras formas de transmissão têm sido descritas como responsáveis pela infecção por *T. cruzi* na população. Dentre essas, pode-se citar: acidentes de laboratório, transplante de órgãos, transmissão oral – penetração da tripomastigota pela mucosa oral (amamentação, canibalismo, alimentos contaminados com fezes de barbeiro) e coito (DIAS, 1999; LANA e TAFURI, 2000; REY, 2002).

Barcan et al. (2005) descreveram caso de transmissão chagásica através do transplante de fígado de um doador infectado por *T. cruzi* para um receptor em emergência. Carvalho et al. (1997) sugeriram transmissão da Doença de Chagas por transplante renal, pela detecção de formas amastigotas de *T. cruzi* em parênquima renal de transplantado anteriormente soronegativo. Já Moretti et al. (2005) relatou caso de gestante que infectou-se por acidente em laboratório.

A transmissão oral desencadeia, em muitos casos, situações de surto com doença aguda, como pode ser verificado em vários relatos. Shikanai Yasuda et al. (1991) sugerem contaminação de 26 pessoas por esta via no estado da Paraíba. Camandaroba et al. (2002) confirmaram experimentalmente infecção gástrica em ratos *swiss* e, quando comparada com infecção intraperitoneal, mostrou similar infectividade e patogenicidade.

Cabe salientar, também, que, a respeito da transmissão oral, há discussões atuais em nossa região devido aos casos que apareceram em surto ocorrido no estado de Santa Catarina pela ingestão do vetor juntamente com caldo de cana (SES/SC, 2005).

4 A Doença

A principal denominação utilizada, Doença de Chagas, deve-se a Carlos Chagas que, em 1909, descreveu o agente, o inseto vetor, o ciclo e o quadro clínico desta doença, a qual pode também ser denominada de tripanossomiose americana, pela distribuição geográfica do vetor (ARAÚJO-JORGE, 1999; COUTINHO et al., 1999).

A forma infectante da doença é a tripomastigota, a qual, ao penetrar no hospedeiro, é fagocitada por células do Sistema Mononuclear Fagocitário, após reconhecimento, adesão e interiorização. No interior destas células, após saírem do vacúolo parasitófago, multiplicam-se na forma de amastigotas, posteriormente alongam-se e voltam à forma de tripomastigotas e são liberadas da célula parasitada. (ARAÚJO-JORGE, 1999; CARVALHO et al., 1999; MORTARA et al., 1999). As formas tripomastigotas livres na corrente circulatória poderão atingir outras células de vários tecidos, como coração, cólon, esôfago, entre outros (LANA e TAFURI, 2000).

O quadro clínico é bastante variado, dependendo da fase da doença (aguda ou crônica), cepa do parasito, local da infecção e resposta do hospedeiro. Na fase

aguda ocorre alta parasitemia, com febre, linfadenite, apatia, cefaléia, edemas, taquicardia e hepatoesplenomegalia (PRATA, 1999). Nesta etapa da doença, os sinais característicos que poderão aparecer estão relacionados com a entrada do parasito que, sendo pela conjuntiva ocular, desenvolve um edema bipalpebral unilateral (Sinal de Romaña), mas caso ocorra pela pele, poderá aparecer uma lesão cutânea com dor e hiperemia, denominada chagoma de inoculação. Acontece, porém, em muitos casos, da fase aguda passar assintomática, com aparecimento de sintomas somente após muitos anos depois, denominada fase crônica indeterminada ou assintomática (ANDRADE, 1999).

É comum a persistência do *T. cruzi* no hospedeiro caracterizando o quadro crônico da doença, o qual mostra, como visto, uma patogenia grave e, na maioria das vezes, irreversível, com conseqüências sérias para o indivíduo. A fase crônica é caracterizada pela presença do parasita em diversos tecidos e baixa parasitemia. A forma cardíaca aparece com degeneração de fibras, arritmias e bloqueios por lesão de células ganglionares, lesões isquêmicas, taquicardia, dilatação de cavidades e hipertrofia e edema, sendo a insuficiência cardíaca congestiva o principal fato clínico (PRATA, 1999). O aumento do órgão, decorrente destas alterações, especialmente hipertrofia e dilatação das cavidades, resulta na denominação de “coração de boi” (LANA e TAFURI, 2000). Freitas et al. (2004) encontraram na Doença de Chagas o maior fator prognóstico para mortalidade em 1.220 pacientes com deficiências cardíacas de diversas causas e relatam, também, ser esta doença a etiologia de 20% destes casos. A patogênese ainda é muito discutida e diversas são as suposições a respeito do mecanismo das lesões. Em estudo relacionando a presença do parasito com o comportamento do cálcio no processo de contração e relaxamento de culturas do músculo cardíaco de ratos, é sugerido que a persistência de *T. cruzi* no coração de pacientes cronicamente infectados pode provocar ativações repetidas das células miocárdicas e, isto, em longo tempo, possa contribuir para a patogênese da Doença de Chagas (GARZONI et al., 2003).

Conforme Rey (2002), este é o órgão que aparece afetado com maior freqüência. É também o problema mais relacionado com a morbidade do paciente e com limitações na produção laboral.

As lesões no aparelho digestório caracterizam o quadro conhecido como magaesôfago e megacólon, com alterações no trânsito, dilatação e atonia. Neste

caso, as complicações mais graves compreendem a obstrução intestinal e a perfuração, levando à peritonite (LANA e TAFURI, 2000).

Além destes órgãos mais afetados, outros tecidos poderão ser acometidos pela infecção chagásica na fase crônica como sistema nervoso, músculo esquelético, fígado, baço e gânglios. Ferreira e Ávila (1996) citaram, ainda, possibilidade de alterações nas vias biliares extra-hepáticas, pâncreas, trato urinário, broncopulmonares e secretórias (glândulas salivares e sudoríparas). Estudo de infecção experimental de *hamsters* demonstrou que lesões de estruturas genitourinárias podem ser esperadas durante a infecção chagásica, com alterações multifocais de intensidade discreta a moderada na fase aguda e focais ou difusas, de intensidade discreta a intensa na fase crônica (CABRINE-SANTOS et al., 2003).

Castro et al (2005), em estudo durante 13 anos, demonstraram que a parasitemia de indivíduos chagásicos, na maioria dos casos, diminui ao longo dos anos, mas pode manter-se ou até elevar-se, podendo permanecer por toda a vida. Porém, sugerem que a alta parasitemia não tem influência na evolução da doença crônica.

Um fator a ser considerado no quadro patogênico desencadeado é a cepa que está infectando o hospedeiro (PRATA, 1999). Determinados clones podem apresentar tropismos por órgãos ou tecidos específicos. A predominância de um clone em determinada região pode contribuir para a tendência a certas manifestações clínico-patológicas (CAMPOS et al., 1999). No RS foram detectados dois *zimodemos* distintos infectando o homem, com populações polimórficas, sendo encontrada relação entre a alta heterogeneidade das cepas de *T. cruzi* com as variadas formas clínicas da Doença de Chagas humana neste estado (FERNANDES et al., 1997). Brito et al (2003) e Macedo et al. (2002) enfatizaram, em seus estudos, a importância da condição imunológica do paciente e da linhagem do parasito no curso da doença.

Por outro lado, o estado clínico do indivíduo e a capacidade do seu sistema imune também têm participação no desenvolvimento da doença, enfatizando-se, relacionado a isto, situações de reativação da doença. Usando camundongo *Swiss* cronicamente infectados por diferentes cepas de *T. cruzi* como modelo experimental, Andrade et al. (1997) testaram uso de drogas imunossupressoras, como simulando situação de transplante, e verificaram mortes em 25% e exacerbação de lesões e sinais clínicos em comparação ao grupo controle. Esta situação de reativação da

doença pós- transplante vêm sendo muito relatada, como ocorrido em paciente chagásica crônica que apresentou lesões cutâneas devido à reativação da Doença de Chagas após transplante de coração (d'ÁVILA et al., 2005).

A co-infecção por *T. cruzi* e HIV tem aparecido como um fator agravante para a Doença de Chagas, modificando seu perfil e permitindo reativação e agudização do quadro, com diversos relatos de meningoencefalite (SILVA et al., 1999; MADALOSSO et al, 2004) e miocardite associadas ou não. Pacheco et al. (1998) sugeriram que a Doença de Chagas cerebral possa ser considerada como uma infecção oportunista na AIDS, resultando dessa a reativação do protozoário.

O tratamento da doença crônica tem sido difícil, visto o agente estar em grande quantidade nos tecidos. Na fase aguda trata-se a alta parasitemia. Em muitos casos a sintomatologia na fase aguda não se pronuncia e o quadro estende-se para a fase crônica. Por outro lado, a diminuição da parasitemia na fase aguda não garante a cura, pois as formas amastigotas teciduais não atingidas multiplicam-se ativamente e mantêm a infecção (REY, 2002).

5 Diagnóstico

Sendo *T. cruzi* um hemoparasita, o qual também poderá estar, em parte do seu ciclo, parasitando células teciduais, diversos procedimentos já foram desenvolvidos para detectar este parasito no indivíduo. O diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas compreende técnicas parasitológicas e técnicas sorológicas.

Os métodos parasitológicos baseiam-se no encontro do próprio agente etiológico, sendo, portanto, bastante específicos. No entanto, nem sempre são suficientemente sensíveis e dependerão da quantidade circulante do hemoparasito, que varia de acordo com o hospedeiro e também do estágio da doença. Na fase aguda a parasitemia é maior, mas na maioria dos casos, tende a diminuir ao longo dos anos, ficando mais baixa na fase crônica da doença (CASTRO et al., 2005).

Entre os métodos parasitológicos podem ser incluídos os exames diretos em lâminas (exame a fresco, esfregaço delgado e corado e gota espessa), hemocultura, xenodiagnóstico, inoculação em camundongos, concentração em tubo capilar, método Strout e punção biópsia de linfonodos (LUQUETTI, 1999; LANA e TAFURI, 2000; REY, 2002).

Dos métodos sorológicos, os quais pesquisam anticorpos específicos produzidos contra o protozoário causador da doença, cita-se: reação de precipitação, reação de imunofluorescência indireta (IFI), reação de ELISA (enzime-linked-immunosorbent-assay), reação de fixação do complemento (RFC), reação de hemaglutinação indireta (RHA), lise mediada por complemento (LMCo), pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos (AATV). (UMEZAWA e SILVEIRA, 1999; LANA e TAFURI, 2000) Exames sorológicos falso-positivos podem ocorrer por reações cruzadas com leishmaniose, rangeliose, toxoplasmose, esquistossomose e hanseníase (UMEZAWA e SILVEIRA, 1999; NEVES, 2003).

Além destes, também já foi utilizado o radioimunoensaio (KERNDT et al., 1991; BRASHEAR et al., 1995). Quanto à qualidade de sua aplicação, estudo de Winkler et al. (1995), mostrou 100% de especificidade e sensibilidade para RIPA e, também, segundo Leiby et al. (2000), RIPA pode ser usado como teste confirmatório, demonstrando especificidade e sensibilidade equivalentes ou superiores quando comparada com *kits* de ELISA, IFI e HAI, havendo restrição no seu uso por ser trabalhoso, requerer reagentes caros e apresentar manipulação que pode ser nociva à saúde.

Outra técnica, disponibilizada hoje no mercado como uma alternativa rápida e simples, é o imunoensaio de partículas em gel (ID-PaGIA), onde o soro e partículas coloridas do antígeno são colocados em um microtubo contendo gel e centrifugados. Em caso de presença de anticorpos específicos haverá aglutinação e, visualmente, será observada uma linha vermelha na parte superior do gel. Na ausência destes, não haverá aglutinação e será visualizado o depósito dos antígenos no fundo do microtubo. A comparação desta técnica com técnicas convencionais no sorodiagnóstico de Chagas - ELISA, RIFI e RHA - demonstrou uma sensibilidade média de 96,8% e especificidade média de 93,8% (RABELLO et al., 1999). Chagas Stat-Pak, outro teste rápido, baseado em imunocromatografia, também se mostrou uma alternativa sensível e específica para o ELISA em emergências médicas e triagem sorológica, pois apresentou 99,6% de sensibilidade e 99,9% de especificidade quando comparado com ELISA em 5.998 amostras de pacientes da América Central (PONCE et al., 2005).

A técnica de PCR, que busca a presença do parasito e detecta concentrações mínimas do antígeno do parasito, tem um valor relevante entre os métodos de diagnóstico. A sensibilidade da técnica de PCR em relação a outras

técnicas é destacada por diversos estudos. Salomone et al. (2003) detectaram PCR positivo em 12 (15%) das amostras de pacientes de área endêmica negativas para métodos sorológicos (IFI, ELISA e HAI), através da identificação de uma banda de 220pb. Anderson (2004) concluiu ter o PCR alta sensibilidade quando comparado com *kit* de ELISA comercial, sendo um método diagnóstico excelente para complementar pesquisas sorológicas em estudos epidemiológicos. Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda (2003) também se preocuparam com a baixa sensibilidade dos exames indiretos e, analisando literatura sobre diagnóstico em Doença de Chagas, consideraram até então, o xenodiagnóstico e a hemocultura como padrão diagnóstico, particularmente quando há sorologia inconclusiva, em pacientes imunodeprimidos e no controle pós-terapêutico. Em relação ao PCR, os mesmo autores, devido ao seu alto custo, necessidade de recursos humanos especializados, infra-estrutura, tempo e risco de contaminação, sugeriram o seu uso como prova confirmatória quando sorologia inconclusiva, no controle pós-terapêutico, em estudos comparativos entre técnicas e na detecção de parasitemia em imunodeprimidos.

Os estudos indicam a necessidade de adequar as características de cada técnica na situação a ser estudada, considerando a parasitemia e o perfil de produção de anticorpos em relação ao estágio da doença. As técnicas parasitológicas parecem apresentar uma menor sensibilidade na fase crônica, pois, como já mencionado, geralmente há menor concentração de parasitos no sangue neste período (CASTRO et al., 2005). Todavia, às vezes torna-se importante o uso de uma técnica mais específica para determinação do diagnóstico. Avaliando o uso de técnicas parasitológicas na Doença de Chagas crônica, Castro et al. (2002) verificaram 63,3% de positividade no PCR e 45,5% na hemocultura. Incluindo uma segunda amostra coletada, houve aumento significativo na positividade para ambas as técnicas, totalizando 86,7% de casos positivos no PCR e 70% na hemocultura. Ainda, na adição de uma terceira amostra, houve aumento de positividade apenas na hemocultura, concluindo que, no mínimo, duas amostras de sangue devem ser coletadas e dois testes devem ser utilizados para o diagnóstico e avaliação de cura pós-tratamento. Além disso, segundo Junqueira et al. (1996), o volume de sangue coletado pode ser importante no diagnóstico de pacientes com baixa parasitemia.

Basso e Moretti (1984) compararam hemocultura e xenodiagnóstico em pacientes chagásicos crônicos com sorologia positiva, aparecendo sensibilidades similares entre as duas técnicas, porém baixas, sendo 55% na hemocultura e 48% no

xenodiagnóstico, enquanto na soma dos dois métodos, a sensibilidade resultou em 65%. Comparando hemocultura e PCR, houve 41,1% de concordância na positividade de PCR e hemocultura em pacientes crônicos, enquanto 22,2% das amostras foram positivas apenas no PCR e 4,4% positivas apenas na hemocultura (CASTRO et al., 2002). Comparando a reatividade das técnicas de PCR, xenodiagnóstico e hemocultura frente a 101 pacientes de região endêmica soropositivos, Junqueira et al. (1996) verificaram positividade de 60/101 (59,4%), 36/101 (35,6%) e 26/101 (25,7%) para PCR, xenodiagnóstico e hemocultura, respectivamente.

Algumas outras alternativas para triagem e diagnóstico da Doença de Chagas aparecem como opções de uso, com alguns métodos não convencionais ou em fluidos biológicos não sangüíneos.

Arrieta et al. (2004) compararam análise de sangue capilar com sangue venoso de 250 amostras nas mesmas técnicas e obtiveram sensibilidade de 98,03% e especificidade de 92,96%, indicando a análise de sangue capilar como um método fácil de implementação e baixo custo. Variando também a forma de coleta de sangue, Palácios et al. (2000) testaram ELISA utilizando amostra coletada em papel filtro comparada com a coleta mais comum de soro total por punção venosa, encontrando resultados semelhantes.

Katzin et al. (1989) propuseram detecção de *T. cruzi* em urina de chagásicos crônicos por um método de aglutinação em látex para uso em estudos epidemiológicos de larga escala e também em casos de sorologia conflituosa. Umezawa et al. (1993) também usaram a urina para pesquisa da Doença de Chagas e encontraram antígeno específico de 150-160 kDa na amostra de 60% de chagásicos crônicos, sugerindo ser este um antígeno urinário de *T. cruzi* específico para a doença.

Barros et al. (1999) utilizaram o transudato da mucosa oral para pesquisar anticorpos IgG contra *Trypanosoma cruzi*, onde 20 dos 21 pacientes chagásico foram considerados positivos pelo valor da densidade óptica, enquanto nenhuma das amostras dos indivíduos não infectados foi positiva. Segundo Pinho et al. (1999) a detecção de anticorpos específicos IgG na saliva pelo método de ELISA também poderá ser utilizado como teste para diagnóstico de triagem e estudos epidemiológicos da infecção crônica da Doença de Chagas, já que apresentou

sensibilidade de 90,4% e especificidade de 95%, além de ser um método não invasivo, reprodutível e que não necessita equipamento especial.

O uso de citometria de fluxo para análise de anticorpos anti-tripomastigotas vivas para monitoramento de cura pós-tratamento foi testado por Martins-Filho et al. (2002). Os resultados validaram o uso da técnica, apresentando uma outra forma de investigar e monitorar a eficácia do tratamento específico para Doença de Chagas.

Ferreira et al. (2005) desenvolveram um imunossensor para o diagnóstico da Doença de Chagas, o qual se baseia na medida da cronoamperometria, do potencial criado pela interação dos anticorpos da amostra com antígenos fixados num eletrodo de ouro, frente a um eletrodo referência. Diniz et al. (2003) também indicaram a possibilidade do uso da impedância para desenvolvimento de um biosensor para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, após testarem soros de chagásicos crônicos usando eletrodos de ouro e platina revestidos com antígenos recombinantes, citoplasmáticos e flagelares de *T. cruzi*.

Lopes et al. (1978) analisaram fluido pericárdico obtido na autópsia de indivíduos com Doença de Chagas cardíaca usando HAI, IFI e fixação do complemento e concluíram serem eficientes no diagnóstico da Doença de Chagas pós-morte, contudo, sugeriram o uso de técnicas combinadas para aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

ARTIGO 1

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma cruzi* EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO REGIONAL DE PELOTAS, RS, BRASIL

RESUMO

A Doença de Chagas, desde a sua descrição, sempre manteve o foco de sua transmissão relacionado à infecção do indivíduo por *T. cruzi* através do vetor durante sua hematofagia. No entanto, com as medidas voltadas ao controle destes, o aumento do êxodo rural e o uso abundante da hemoterapia, a transmissão deste protozoário por transfusão sangüínea tornou-se significativa para a propagação da doença, especialmente nos centros urbanos. Desta forma, buscou-se verificar soropositividade para *T. cruzi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas (Hemopel). Para isso foram analisadas 4.482 amostras dos candidatos à doação no Hemopel, no período de 2004-2005, através de triagem sorológica por método de ELISA. As amostras que apresentaram reatividade na triagem inicial foram também processadas por outras técnicas sorológicas (HAI, IFI, outros dois kits de ELISA e *imunoblot*). Dos casos considerados positivos para infecção por *T. cruzi*, foram analisados dados que pudessem apresentar importância epidemiológica para esta Doença. Das 4.482 amostras analisadas, 43 (0,96%) apresentaram reatividade na triagem inicial e 21 (0,47%) foram consideradas positivas para *T. cruzi*. Analisando características dos indivíduos infectados, observou-se maior número (10/21) entre indivíduos naturais de Canguçu, com primeiro grau incompleto, sexo feminino e maiores de 40 anos, sendo a idade média de 47,2 anos. A Doença de Chagas apareceu como a segunda causa de descarte de bolsas de sangue por reatividade entre os agentes infecciosos pesquisados na triagem para doadores no Hemopel. Assim, percebe-se a possibilidade de transmissão da Doença de Chagas por esta via, fazendo-se importante traçar estratégias de controle, incluindo triagem de doadores consciente, triagem sorológica cuidadosa e utilização do tratamento hemoterápico apenas quando necessário.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Transmissão transfusional. Transfusão sangüínea. Banco de sangue. Triagem sorológica

ARTICLE 1

ANTIBODIES ANTI-*Trypanosoma cruzi* DETECTION IN BLOOD DONORS OF REGIONAL HEMOCENTER OF PELOTAS, RS, BRAZIL

ABSTRACT

The Chagas disease, since its description, was always associated to the transmission related on the infection caused by the *T.cruzi* through the hematophagous vector. However, with the control measures adopted, the raise of rural exodus and the use of chemotherapy, the transmission of this protozoary by blood transfusion became significant to the spread of the disease, especially in the urban centers. Blood donors of the Regional Hemocenter of Pelotas (Hemopel) were analyzed to verify the seropositivity for *T.cruzi*. 4.482 serum samples of all donors candidate in the Hemopel during the years of 2004-2005, were tested by serological triage by ELISA test. The samples which present reactivity in the initial triage were also tested by others serological techniques (Indirect hemoagglutination (IH), Indirect Immunofluorescence (IIF), others two ELISA kits and Immunoblot). In the cases which ones were considered positives to the *T.cruzi* infection, the epidemiological data with importance to the spread of this disease were analyzed. 43(0,96%) of the analyzed samples present reactivity in the initial triage and 21 (0,41%) were considered positives. In the infected individual some characteristics were analyzed and was observed an incidence (10/21) between the individuals from Canguçu county, with first degree incomplete, female and over 40 years old (average age 47,2). The Chagas disease represents the second cause of discharge of blood bags by reactivity among the infectious agents researched in the donors triage in the Hemopel. This finding suggests the possibility of the transmission by transfusional pathway of the Chagas disease, indicating the necessity of adoption of control measures, including the awareness of the donors, carefully serological triage and responsible use of chemotherapy.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Transfusional transmission. Blood transfusion. Blood bank. Serological triage.

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, quando descrita pelo pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Chagas em 1909, apresentava insetos hematófagos das habitações como vetores responsáveis pela sua transmissão, permanecendo esta, por longo tempo, a forma mais importante de transmissão de *T. cruzi*. Perante esta situação, as medidas de controle para esta doença sempre estiveram mais voltadas aos insetos. Um momento importante no histórico da doença refere-se à campanha maciça de combate aos triatomíneos e melhoria das habitações, implementada pela Fundação Nacional de Saúde no período de 1975 a 1997 (SILVEIRA e VINHAES, 1999; ALMEIDA et al., 2000).

A partir daí, as formas de transmissão não vetoriais tornam-se relevantes na propagação da doença, especialmente nos centros urbanos. Reportando-se ao ciclo desenvolvido pelo parasito no hospedeiro vertebrado, é conhecida a presença da forma tripomastigota deste protozoário no sangue periférico do indivíduo. Na evolução da doença, sabe-se, também, que a parasitemia é maior na fase aguda, porém, permanece por todo o período de infecção, podendo oscilar em situações especiais (CASTRO et al., 2005). Portanto, a transmissão transfusional torna-se uma importante via de disseminação da Doença de Chagas. De uma unidade/bolsa doada, podem ser produzidos vários hemocomponentes (concentrado de hemáceas, plasma, plaquetas e crioprecipitado), para serem usados com finalidades diferentes e em diversos receptores. Todos os hemocomponentes do sangue que não passem por processos de esterilização podem ser veículos de *T. cruzi*. (ANVISA/MS, 2005). Assim, a bolsa de um indivíduo infectado que não seja devidamente bloqueada na triagem sorológica, pode resultar na infecção de um ou mais transfundidos. A real possibilidade de risco de transmissão por esta via é evidenciada pelos dados de positividade para infecção por *T. cruzi* entre doadores de sangue em diversas localidades. Em busca de dados de diversos serviços de hemoterapia no Brasil, foi calculado um descarte de 1,09% de bolsas por reatividade nos testes de triagem para Doença de Chagas (WENDEL et al., 2004). Em doadores do Centro Regional

de Hemoterapia de Ribeirão Preto (São Paulo), 1,1% dos doadores foram positivos para Doença de Chagas de 1996 a 2001, porém, a maioria era proveniente de outros estados (SOUSSUMI et al., 2004). Entre os candidatos à doação de sangue em hospital do Rio de Janeiro, a prevalência de infecção por *T. cruzi* encontrada foi 1,17% (SILVEIRA et al., 2003). Bracho et al. (1998) pesquisaram 18 bancos de sangue no México, calculando um índice médio de 1% de positividade para Doença de Chagas, variando conforme a região do país. Schmunis et al. (1998) observaram, entre os doadores que passaram por triagem sorológica, prevalência para *T. cruzi* de 14,79 % na Bolívia, 1,2% no Chile e Colômbia, 0,2% no Equador, 1,47% em El Salvador, 1,4% na Guatemala, 1,34% em Honduras, 0,24% na Nicarágua, 4,5% no Paraguai e 1,32% na Venezuela. No Peru, os mesmos autores verificaram 1,32% de positividade num determinado número de amostras selecionadas, já que neste país não havia dados referentes à triagem. Em Los Angeles, Califórnia, EUA, este índice foi de 1,1% (KERNDT et al., 1991).

Conforme a legislação brasileira, perante a preocupação de transmissão da Doença de Chagas por esta via, a pesquisa de infecção por *T. cruzi* entre os doadores é obrigatória, de acordo com a RDC/ANVISA (Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA) 153/ 2004. No entanto, isto não acontece em todos os países onde há a doença. Em 12 países da América estudados por Schmunis et al. (1998), apenas dois deles (Venezuela e Honduras) realizavam triagem para este protozoário em 100% dos doadores, Peru e Costa Rica ainda não faziam triagem para Doença de Chagas até 1993 e, nos outros países, a triagem era realizada em parte dos doadores, sendo o número de doadores triados/total de doadores x 100 igual a 29,4% na Bolívia, 76,7% no Chile, 1,4% na Colômbia, 51% no Equador, 42,5% em El Salvador, 75% na Guatemala, 58,4% na Nicarágua e 86,8% no Paraguai.

Embora a doação de sangue possa ser realizada por qualquer indivíduo entre 18-65 anos e, aparentemente, sadios (RDC/ANVISA 153/2004), dentre os doadores prevalecem os candidatos do sexo masculino, variando a diferença de sexo de acordo com cada estabelecimento. Em Puebla, México, Monteón et al. (2005) encontraram a proporção de uma mulher para nove homens, sendo 79,9% na faixa de 18-39 anos e 20,1% entre 40-60 anos de idade, enquanto Sánchez-Guillén et al. (2002) registraram proporção de 1:3 mulheres/homens, com idade média de 32 anos. Em Ribeirão Preto, São Paulo, 83,6% eram do sexo masculino, e a faixa etária prevalente (64,1%) foi de 26-45 anos (SOUSSUMI et al., 2004). Também em

hospitais de Porto Alegre e Goiás, os homens prevaleceram entre os doadores, sendo cerca de 70% (CAPRA et al., 2005; ONSTEN et al., 2005; LONGATTI et al., 2005). Dentro deste grupo de doadores, analisando dados de serviços de hemoterapia, a infecção por *T. cruzi* aparece mais comumente em indivíduos do sexo masculino (SILVEIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; SANTOS et al., 2005) e a partir dos 40 anos (SILVEIRA et al., 2003; MONTEÓN et al., 2005; ONSTEN et al., 2005).

Quanto aos candidatos à doação, um fator significativo para a qualidade do sangue consiste nos doadores de repetição. Em alguns bancos de sangue, o alto índice de indivíduos que realizam doação com regularidade faz diferença no aproveitamento do sangue, havendo menos probabilidade de descarte, pois estes doadores fazem a triagem sorológica constantemente e mantêm um estilo de vida com menor risco à aquisição de doenças infecciosas (SALLES et al., 2003).

Para a legislação vigente nos serviços de hemoterapia (RDC/ANVISA 153/2004), deverá ser realizada triagem sorológica para a Doença de Chagas usando um método imunoenzimático de elevada sensibilidade. O primeiro teste utilizado para detecção de infecção por *T. cruzi* em bancos de sangue foi a fixação do complemento, porém é hoje sugerida a técnica de ELISA como a metodologia de escolha para triagem sorológica, ficando a HAI (hemaglutinação indireta) como uma alternativa de segunda escolha, já que foi eliminada a obrigatoriedade do uso de duas técnicas (ANVISA/MS, 2005). Em hospital do Rio de Janeiro foi registrado o uso de HAI como técnica de triagem e ELISA para confirmação dos resultados (SILVEIRA et al., 2003). No México, Bracho et al. (1998) também verificaram a HAI indireta como método de triagem, porém, usando a IFI (imunofluorescência indireta) como teste confirmatório. Quando da obrigatoriedade de duas técnicas, geralmente eram usados ELISA e HAI associadas (SANCHÉZ-GUILLÉN et al., 2002; SOUSSUMI et al., 2004), variando, porém, em alguns casos. Em Los Angeles, Califórnia, EUA, usava-se fixação de complemento e IFI na triagem e RIPA – radioimunoprecipitação como método confirmatório (KERNDT et al., 1991).

Algumas técnicas hoje disponíveis no mercado aparecem como alternativas de testes rápidos e de simples execução. Rabello et al. (1999) apresentaram imunoensaio em microtubos de gel (ID-PaGIA® – Diamed), em que o soro e partículas coloridas do antígeno são colocados no microtubo contendo gel e centrifugados. Em caso de presença de anticorpos específicos haverá aglutinação e,

visualmente, será observada uma linha vermelha na parte superior do gel. Na ausência destes, e, portanto, da aglutinação, será visualizado o depósito dos antígenos no fundo do microtubo. A comparação desta técnica com técnicas convencionais no sorodiagnóstico de Chagas como ELISA, IFI e HAI, demonstrou uma sensibilidade média de 96,8% e especificidade média de 93,8%. Chagas Stat-Pak, outro teste rápido baseado em imunocromatografia, também se mostrou uma alternativa sensível e específica para o ELISA em emergências médicas e triagem sorológica, pois apresentou 99,6% de sensibilidade e 99,9% de especificidade quando comparado com ELISA em 5.998 amostras de pacientes da América Central (PONCE et al., 2005).

Complementando o processo de pesquisa de agentes infecciosos no sangue, além da pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, a legislação (RDC/ANVISA 153/2004) exige pesquisa de outras doenças transmissíveis pelo sangue: hepatite B (pesquisa de anti-HBc e HBsAg), hepatite C (pesquisa de anti-HCV), HTLV – vírus linfotrópicos das células T (anti-HTLV I e anti-HTLV II), sífilis (pesquisa de anticorpos por teste treponêmico ou não treponêmico), HIV (pesquisa de anti-HIV 1, anti-HIV 2 por dois testes diferentes). A transfusão de qualquer hemocomponente só é liberada após resultados não reagentes para todos os testes realizados.

Afora o processo de triagem clínica de doadores e pesquisa sorológica, existem alguns outros procedimentos sugeridos para a prevenção da transmissão de *T. cruzi* pela transfusão de sangue. Moraes-Souza et al. (1995) investigaram a eficácia de filtros de redução de leucócitos como um método alternativo de reduzir a incidência da Doença de Chagas transfusional, já que evidenciaram redução no número de *T.cruzi* de sangues infectados, porém, dependendo, em parte, da concentração dos parasitos no sangue, sendo conveniente delimitar novos estudos acerca da utilização desta alternativa.

Outra alternativa para a prevenção da Doença de Chagas transfusional é a quimioprofilaxia, pela adição de substância tripanomicida, tal como o uso da violeta genciana. A fim de aumentar a viabilidade deste processo, Ramirez et al. (1995) testaram associação de ácido ascórbico e fotorradiação à uma menor concentração da violeta genciana, de modo a reduzir o tempo de esterilização e efeitos colaterais dessa substância.

Zavision et al. (2004) investigaram a possibilidade de uso do agente eletrofílico INACTINE PEN 110 como inativador de patógenos de células do sangue, como *T. cruzi*, por interrompimento da replicação do ácido nucléico e observaram este ser efetivo na erradicação da transmissão de protozoários por transmissão transfusional.

A constante preocupação com a vigilância no processamento do sangue e de sua qualidade tem garantido melhoria no controle da Doença de Chagas por transmissão transfusional. De acordo com dados do MS/ANVISA (2005), nos anos 70 estimava-se ocorrência de 20.000 novos casos de Doença de Chagas/ano por esta via, com centros oscilando entre 3,9% a 10,43% entre os doadores, situação aparentemente modificada analisando-se os dados atuais. Estudo retrospectivo de um período de quase cinco anos do Hemocentro Regional de Sobral – CE aponta redução progressiva da prevalência de doadores infectados por *T. cruzi* nesta região (ALMEIDA et al., 2005). Também, Figueiredo et al. (2005) e Sabino et al. (2003) observaram declínio do índice de positividade sorológica na Bahia e São Paulo, respectivamente. Outro estudo em São Paulo, comparando períodos diferentes, demonstrou decréscimo na prevalência de Doença de Chagas de 0,7% em 1991 para 0,14% em 2001 na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (SALLES et al. 2003). Entretanto, isto não deverá ser motivo para descaso no controle desta doença, pois mesmo com a aparente diminuição de seus valores de prevalência, ainda permanece presente na população, como mostra o estudo de De Paula et al. (2004) em São Paulo, onde observaram transmissão transfusional da Doença de Chagas em 0,84% dos pacientes politransfundidos. Portanto, o conhecimento de casos de infecção por transfusão sangüínea, assim como das possibilidades de que isto ocorra, caso não haja controle da qualidade do sangue usado na hemoterapia, justificam a investigação da transmissão da Doença de Chagas em bancos de sangue.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a sororreatividade para *Trypanosoma cruzi* em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas (Hemopel), no período de 2004-2005.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em doadores de sangue do Hemopel por ELISA, técnica de rotina na triagem sorológica da Doença de Chagas.
- Analisar amostras de sangue reativas para *T. cruzi* na triagem frente a outras técnicas sorológicas e, pelo conjunto de resultados destas, usando TESA-Blot como técnica padrão, determinar a infecção por *T. cruzi*.
- Verificar fatores epidemiológicos relacionados com os doadores considerados positivos para a Doença de Chagas.
- Estimar o descarte de bolsas de sangue devido à Doença de Chagas, comparando com outras doenças infecciosas pesquisadas na triagem sorológica.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

A amostra foi constituída por todos os doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas do período de 1º de janeiro de 2004 a 31 de dezembro de 2005.

De acordo com a RDC/ANVISA 153/2004, em vigência, são candidatos a doadores de sangue indivíduos, homens ou mulheres, entre 18 e 65 anos, aparentemente saudáveis e que não estejam cadastrados na lista de Impedidos da Vigilância Sanitária (nesta lista são incluídos, por todos os Bancos de Sangue do estado, todos os doadores que fiquem inaptos temporária ou definitivamente por algum motivo contido na legislação).

Os doadores de rotina no Hemopel durante o período do estudo foram moradores de Pelotas e provenientes de municípios vizinhos como Santa Vitória do Palmar, São Lourenço do Sul, Pinheiro Machado, Arroio Grande, Herval, Pedro Osório, Canguçu, entre outras.

Todos os candidatos à doação passaram pelas seguintes etapas: cadastro na recepção, onde foram verificadas as condições de idade e presença ou ausência na Lista dos Impedidos; pré-triagem; triagem clínica; coleta do sangue e análise laboratorial das amostras.

Pré-Triagem (avaliação do estado físico), segundo RDC/ANVISA (Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA) nº 153/2004. Nesta etapa, o candidato à doação foi averiguado nos seguintes parâmetros:

- pressão arterial: sistólica ≤ 180 mmHg e ≥ 90 mmHg e a diastólica ≥ 60 mmHg e ≤ 100 mmHg;
- anemia: para mulheres, hemoglobina $\geq 12,5$ g/dL e hematócrito $\geq 38\%$ e para homens, $\geq 13,0$ g/dl e 39% , respectivamente;
- pulso: apresentar características normais, ser regular e de frequência entre 60 e 100 batimentos por minuto no repouso;
- peso: mínimo de 50 Kg;

- temperatura axilar: < 37°C.

Após esta etapa, caso estivesse de acordo com as condições físicas estabelecidas, passava para a etapa de triagem clínica, uma entrevista realizada por profissional capacitado a fim de eliminar candidatos com risco de contaminação, visto que alguns casos podem não ser detectados nos exames sorológicos, por falhas nas técnicas ou, principalmente, período de janela imunológica. Para este procedimento, foi utilizado um questionário como instrumento (Anexo A), o qual contempla diversas situações que denunciem um indivíduo com risco de infecção, e dentre estas questões, alguns itens estão relacionados também com a Doença de Chagas.

“ Os candidatos com história de terem sido picados por Triatomíneo ou com diagnóstico clínico ou laboratorial de doença de Chagas devem ser excluídos de forma permanente.” (RDC/ANVISA 153/2004)

3.2 Coleta de Sangue

A coleta de sangue para os exames sorológicos foi realizada no momento da doação de sangue, ou seja, no mesmo acesso venoso, sem jejum, em tubo separado sem anticoagulante e com identificação própria. Em caso de coleta de 2ª amostra solicitada para repetição de exames, o indivíduo foi puncionado via venosa, com coleta apenas no tubo específico para a sorologia.

3.3 Processamento do Sangue para análise

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e os soros separados, devidamente identificados e armazenados em geladeira (2-8°C) até serem analisados (máximo 1 semana). De todas as amostras foi separada uma alíquota em frasco tipo *Eppendorf* rotulado para armazenamento em banco de amostra (soroteca) à temperatura de -20°C.

3.4 Triagem sorológica - Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* pelo método de ELISA

Os testes foram realizados no laboratório de sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas através de teste de ELISA automatizado utilizando *kit* CHAGATEST® (Wiener lab, Argentina), disponibilizado no mercado com metodologia própria. Este *kit* apresenta adsorvidos na microplaca os antígenos recombinantes Ag1, Ag2, Ag 13, Ag 30, Ag 36 e Ag SAPA, sendo este último da forma tripomastigota do parasito, forma circulante no indivíduo infectado.

Descrição da técnica: Adição de 200µl de diluente de amostras (albumina bovina em solução fisiológica tamponada com tampão fosfato pH 7,2) em cada orifício da microplaca e de 10µl dos soros em teste e controles negativos e positivos, seguido de homogeneização. Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5 X) com solução de lavagem preparada da diluição de 1 parte de cloreto de sódio 1,4mmol/L em tampão fosfato 100mmol/L e tensoativo não iônico 0,1g/L em 4 partes de água destilada. Adição de 50µl de conjugado, composto de anti-imunoglobulina humana, produzida em cabra, conjugada com peroxidase. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (5X). Adição de 100µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio 60mmol/L em tampão citrato 50mmol/L pH 3,2 com tetrametilbenzidina (TMB) 0,01mmol/L em ácido clorídrico 0,1N. Incubação por 20 minutos a 18-25°C. A reação é interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em 450nm.

Cálculo do *cut off* média dos controles negativos + 0,300

Amostras foram consideradas reagentes quando densidade óptica superior a 10% do *cut off* e reagentes inconclusivas quando densidade óptica \pm 10% *cut off*.

Para controle da reação foram utilizados controles positivos e negativos do próprio *kit*, assim como controles próprios preparados por diluição a partir de um *pool* de soros positivos em um *pool* de soros negativos de amostras provenientes da rotina do próprio laboratório. Quando os controles não estavam de acordo com os parâmetros esperados, o teste era repetido em todas as amostras daquela bateria.

3.5 Repetição dos Exames

Qualquer das amostras que tenha apresentado reatividade na triagem foi registrada em livro específico e repetida. Amostras com valores acima do valor do *cut off* e com valores dentro dos 10% inferiores foram repetidas do próprio tubo que foi testado, numa outra alíquota retirada do “tubo-mãe” e de uma alíquota da bolsa de plasma. Amostras com valores de densidade óptica (absorbância) entre 10 e 25% inferiores ao *cut off* também foram repetidas para uma maior segurança na triagem. Se o resultado obtido nestas repetições foi reagente inconclusivo ou reagente, foi solicitada coleta de nova amostra do doador, a qual foi analisada pela mesma técnica (Elisa Chagatest).

Quando o paciente retornou para coleta de 2º amostra, o sangue foi analisado pela mesma metodologia, agora em duplicata, sendo o resultado liberado como não reagente, indeterminado ou reagente. Em caso de não reagente, o indivíduo foi convidado a retornar como doador; em caso de reagente inconclusivo, o indivíduo foi orientado a retornar dentro de três meses para coleta de nova amostra e em caso de resultado reagente, o indivíduo foi encaminhado para assistência médica.

O laudo de resultado do exame a ser liberado para o paciente continha a seguinte nota: “Estes são exames de triagem sorológica para fins de doação de sangue ou órgãos, não se aplicando para fins de diagnósticos. Os resultados não são definitivos, deverão ser repetidos nos serviços de referência para diagnóstico.” Isto torna-se importante já que o ideal seria confirmação dos resultados por outra técnica, como a imunofluorescência, e esta não foi realizada na maioria das amostras antes da liberação dos resultados.

3.6 Determinação dos casos positivos para a Doença de Chagas

Para classificar cada indivíduo como positivo ou negativo para Doença de Chagas, todas as amostras de sangue disponíveis (1ª e 2ª coleta) dos doadores que apresentaram reatividade na triagem foram processadas por outras quatro técnicas sorológicas: CHAGATEK® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e ELISA ALKA, HA (CHAGATEST HAI® – screening A-V - Wiener lab, Argentina) e IFI

(IMUNOCRUIZ® - biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil), todas com metodologia própria, para comparação dos resultados. Quando houve resultados discordantes entre estas, a amostra foi também analisada pelo TESA-Blot (UMEZAWA et al., 1996), servindo este como método confirmatório e padrão para o diagnóstico convencional da Doença de Chagas.

3.6.1 ELISA CHAGATEK® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Os testes com este *kit* foram realizados manualmente no Laboratório de Sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas, havendo-se utilizado o aparelho apenas para a leitura final da placa.

Descrição da técnica: Adição de 200µL de diluente da amostra em cada cavidade (solução protéica base PBS estabilizada). Adição de 10µl de amostras e controles negativos e positivos. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X) com solução de lavagem preparada da diluição de uma parte de tampão fosfato concentrado em 24 partes de água destilada. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:10 de anticorpo monoclonal anti-IgG humana marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X). Adição de 100µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio com tetrametilbenzidina (TMB). Homogeneização. Incubação por 10 minutos a 20-25°C ao abrigo da luz. A reação é interrompida pela adição de 100µl de ácido sulfúrico 1mol/L e a leitura realizada em 450nm, utilizando ar como branco.

Cálculo do *cut off*: média dos controles negativos + 0,100

Interpretação do teste: uma amostra é considerada não reativa se sua DO é inferior ao valor do *cut off*, ao tempo que será considerada reativa se sua DO é igual ou superior ao valor do *cut off*.

3.6.2 ELISA EIAGEN *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália)

O *kit* imunoenzimático EIAGEN *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália), comercializado com metodologia própria, como visto na sua identificação, é destinado para a determinação de anticorpos de classes IgG e IgM

em soro ou plasma humanos. A análise das amostras por este *kit* foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia e Centro de Biotecnologia, na Universidade Federal de Pelotas.

Descrição da Técnica: Diluição da amostra na proporção de 1:101 (10µl de soro em 1mL de diluente – solução protéica contendo detergente, estabilizantes protéicos e preservativos). Adição de 100µl de soro diluído e controles positivo e negativo nas cavidades da microplaca, reservando a cavidade A1 para o branco de amostra. Incubação por 60 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera) com solução preparada a partir de tampão 25X concentrado, contendo imidazole, Tween 20 e preservativo. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:20 de anticorpo específico anti-IgG&M marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica tamponada. Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera). Adição de 100µl da solução substrato, composta de mistura estabilizada de TMB e água oxigenada, pronta para uso. Incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Adição de solução de parada (ácido sulfúrico 0,3M), seguida de homogeneização. Leitura em comprimento de onda de 450nm em até 60 minutos, zerando com a cavidade A1.

Cálculo do *cut off*: média dos controles negativos + 0,200

Interpretação do teste: amostras com valor de densidade óptica menor que o *cut off* são classificadas como negativas, enquanto amostras com valor maior que o *cut off* são consideradas positivas para os anticorpos anti-*T.cruzi*.

3.6.3 HEMAGLUTINAÇÃO - CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina)

A técnica de hemaglutinação indireta foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas utilizando *kit* CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina), com metodologia própria, o qual utiliza-se de hemáceas de aves sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de membrana de *T. cruzi* para produzir aglutinação em presença de anticorpos específicos.

Descrição da técnica: Diluição da amostras e controles 1/40 (10µL de amostra e controles em 400µL de diluente, composto de solução protéica em tampão). Adição

de 50µL das diluições de amostras e controles em nas cavidades da microplaca de fundo em V. Adição de 25µL de antígeno nas cavidades. Mistura aplicando batidas suaves durante, no mínimo, 30 segundos. Repouso por 60 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de vibrações. Leitura visual: considerando-se não reativo quando há presença de um sedimento em forma de botão nítido e uniforme no fundo da cavidade; reativo fraco quando visto um manto pequeno no fundo da cavidade com botão definido no centro e fortemente reativo quando verificada formação de um filme ou manto de contornos irregulares no fundo da cavidade.

Em caso de amostras que apresentaram reatividade, mesmo que fraca, foi realizada a prova quantitativa, de mesma metodologia, porém realizando-se diluições seriadas do soro na placa. O título considerado corresponde à maior diluição de soro reativo.

Valor de referência indicado: com alerta de que este valor seja em termos de probabilidade, a indicação é de que consideram-se presumivelmente parasitados os indivíduos cujos soros são reativos com títulos maiores ou iguais a 1/40.

3.6.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - IMUNOCRUIZÍ® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Preparo das lâminas:

As lâminas foram preparadas com fixação de antígeno de *T.cruzi* obtido por cultivo em meio de LIT, sob a forma de epimastigota, comercializado pela biolab-Mérieux (Imunocruzi®). A fixação do antígeno foi procedida conforme descrição do fabricante. As lâminas foram armazenadas em freezer -20°C para uso posterior.

Titulação do conjugado:

Sendo o título do conjugado variável para cada lote e devendo adequar-se em função dos reagentes e equipamentos usados, seguindo especificações do fabricante, foi estipulado o título a ser diluído o conjugado para análise das amostras. O conjugado utilizado foi antigamaglobulina de carneiro anti IgG humana marcada

pelo isotiocianato de fluoresceína, FLUOLINE® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil).

Solução reveladora:

De acordo com especificação da técnica, usou-se azul de Evans em solução estoque de 10%, sendo esta diluída a 1% na hora de preparar o conjugado para uso.

A cada bateria de testes era retirada a quantidade de lâminas necessária do congelador, secadas a temperatura ambiente e identificadas para uso.

As amostras selecionadas para análise eram diluídas em PBS usando como base os resultados prévios do ELISA para o número de diluições a serem realizadas inicialmente para cada amostra. Caso não fosse suficiente, a amostra era submetida a análise novamente na próxima bateria de testes com um número maior de diluições.

Descrição da técnica: Adição de 20µl de cada diluição de soro por área. Incubação a 37°C/30 min em câmara úmida. Lavagem 2X /5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Adição de 20µl de conjugado em diluição pré-estabelecida preparado na hora do uso. Incubação a 37°C/30 min em câmara úmida. Lavagem 2X/5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Montagem para leitura com glicerina tamponada e lamínula. Observação em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40x.

Interpretação do teste: reação positiva era considerada quando observada fluorescência verde brilhante periférica ou por toda superfície dos protozoários e reação negativa quando os parasitos apresentavam cor vermelha ou coloração verde fosca.

A cada bateria de testes a reação era controlada por dois controles positivos e dois controles negativos.

3.6.5 TESA – BLOT

O Imunoblot com antígeno TESA (antígeno de excreção e secreção de *T. cruzi*) foi aplicado em amostras que apresentavam resultados discordantes entre as técnicas, resultando em uma sorologia duvidosa.

As membranas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram gentilmente cedidas pela Dra. Eufrosina Umezawa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, acompanhadas de protocolo de realização da técnica e padrões positivos para análise dos resultados.

Conforme descrito por Umezawa et al. (1996), o TESA é obtido do sobrenadante da cultura de células LLC-MK₂ infectadas com cepa Y de *T. cruzi*.

As membranas contendo antígenos e bloqueadas com PBS pH 7,2 contendo leite em pó desnatado 5% foram cortadas em tiras de 0,4cm e incubadas com soro diluído 1:150 em PBS 7,2 com 1% leite por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, foram lavadas quatro vezes por cinco minutos em tampão PBS 7,2. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®), diluído 1:3000 em PBS 7,2 com leite 1% por 2 horas, sob agitação constante em temperatura ambiente. Novamente foram lavadas e cobertas por solução reveladora contendo 4-cloro-naphtol e água oxigenada em metanol e PBS 7,2 até que as bandas aparecessem. Para interrupção da reação, foram lavadas em água destilada e secas em papel filtro para posterior análise das bandas, comparando com tira positiva para soro padrão.

Segundo padrão de diagnóstico, amostras IgG positivas para *T. cruzi* reagem com banda de 150-160kDa. Vários pacientes de fase crônica também reagem com bandas SAPA (*shed acute-phase antigen*) de PM que varia de 120-210 kDa e uma banda de aproximadamente 95kDa.

Amostras com resultado duvidoso foram repetidas em concentração de 1:100.

A técnica de TESA-Blot foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3.7 Levantamento de Dados

O levantamento de dados referente ao perfil dos candidatos à doação do Hemopel foi rastreado a partir dos relatórios encaminhados mensalmente para a Vigilância Sanitária por todos os setores (HEMOPROD – *Relatório da Produção Hemoterápica*)

Os dados relacionados às repetições foram verificados nos livros de registro de doador e livro de repetições do setor de sorologia, onde é encontrada a situação de cada doador após a triagem sorológica, além de todas as repetições que foram realizadas em amostras.

Os dados dos doadores positivos para Doença de Chagas (sexo, idade, naturalidade, local de residência atual, grau de escolaridade e ocupação atual) foram pesquisados na ficha de cadastro destes doadores arquivadas no Hemopel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005 foram realizadas 4.482 coletas de sangue em doadores do Hemocentro Regional de Pelotas. Todas as amostras passaram por triagem para *T. cruzi* pela técnica de ELISA, sendo 0,96% (43/4.482) reativas para este hemoparasita (fig. 1).

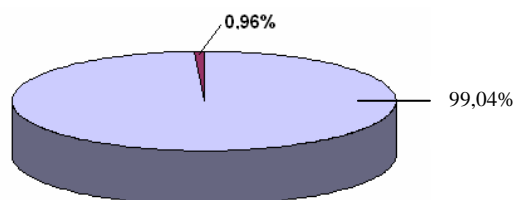


Figura 1 – Porcentagem de amostras de sangue reativas para *T. cruzi* pela técnica de ELISA Chagatest utilizada no teste de triagem de rotina entre os doadores do Hemopel no período de 2004-2005.

Em Porto Alegre, também no Rio Grande do Sul, Capra et al. (2005) e Juckowsky et al. (2005) descrevem resultados inferiores, tendo sido 0,32% e 0,57% no Serviço de Hemoterapia da Santa da Casa e do Hospital de Clínicas, respectivamente. Provavelmente, os resultados do presente estudo, próximos a 1%, sejam devido a muitos doadores serem oriundos de área rural e endêmica para Doença de Chagas. Resultados superiores foram verificados por Soussumi et al. (2004), com 2,43% de amostras reativas entre os doadores do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, São Paulo, no período de 1996 a 2001. No Hemocentro de São Paulo, a reatividade para Doença de Chagas em 2001 foi de 1,14% (SALLES et al., 2003). No México, Puebla, Monteón et al. (2005) demonstraram que 1,4% dos doadores de sangue de área rural e suburbana foram positivos na triagem sangüínea por ELISA, ao tempo que, Sanchéz-Guillén et al (2002) apresentaram prevalência de 9,8% amostras reativas para Doença de Chagas em pelo menos uma das duas técnicas de triagem.

O valor de densidade óptica das 43 amostras reativas no ELISA Chagatest usado na triagem sorológica pode ser observada na fig. 2, onde é possível observar 15 amostras altamente reativas (DO >1,5), 10 amostras com reatividade intermediária (DO 0,5-1,5) e 18 amostras com valores próximos ao limiar de reatividade (DO <0,5).

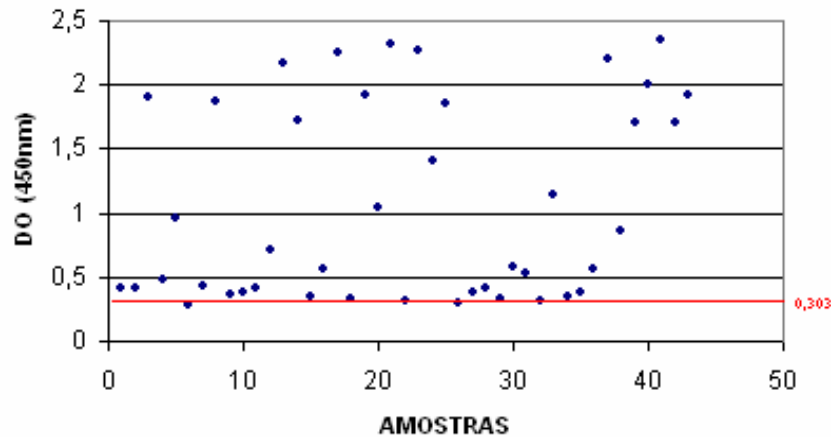


Figura 2 – Valores das densidades óticas (450 nm) obtidas na leitura do ELISA Chagatest na pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* das amostras de doadores que apresentaram reatividade na triagem sorológica. A linha horizontal representa o valor de *cut off*.

Todos os indivíduos cujos testes foram reativos, como rotina do Hemopel, foram chamados para uma segunda coleta, comparecendo apenas 31 destes.

Para a legislação em vigor, não é obrigatória a confirmação dos resultados de testes da triagem reagentes para a Doença de Chagas nos serviços de hemoterapia, mas sim, a convocação e orientação do doador com resultados reagentes. No entanto, pela rotina realizada no Hemopel, todos estes 43 indivíduos com resultados reagentes ou reagentes inconclusivos foram convocados para retorno e coleta de nova amostra (2ª amostra), a qual foi novamente processada pela técnica de ELISA usada na rotina da triagem.

Na tab. 1 estão apresentados os resultados da reatividade inicial das 43 amostras da 1ª coleta e os resultados das 31 amostras de 2ª coleta, todos avaliados pelas cinco técnicas utilizadas (ELISA Chagatest, ELISA Chagatek, ELISA Adaltis, HAI e IFI) e, nos casos indefinidos, também os resultados do TESA-Blot.

Tabela 1 – Resultado obtido nos diversos métodos sorológicos das amostras que apresentaram reatividade na triagem sorológica e da nova coleta de doadores do Hemopel

Amostra	ELISA Chagatest ¹		ELISA Chagatek ²		ELISA Adaltis ³		HAI		IFI		TESA Blot	Resultado Final
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª		
1	R	RI	R	R	R	R	R	R	NR	R	R	POSITIVO
2	R	RI	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	POSITIVO
4	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
5	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
6*	RI	-	NR	-	R	-	NR	-	NR	-	NR	NEGATIVO
7	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
8	R	R	NR	NR	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
9	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
10	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
11	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
12	R	R	R	R	R	R	NR	NR	NR	NR	R	POSITIVO
13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	POSITIVO
14	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	NR	R	POSITIVO
15	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POSITIVO
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	POSITIVO
18	RI	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	POSITIVO
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POSITIVO
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	POSITIVO
22	RI	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
23*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-	POSITIVO
24	R	NR	R	-	R	NR	R	-	R	-	R	POSITIVO
25*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-	POSITIVO
26*	RI	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	-	NEGATIVO
27	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
28*	R	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	-	NEGATIVO
29*	RI	-	NR	-	R	-	NR	-	NR	-	NR	NEGATIVO
30	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
31	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NEGATIVO
32	RI	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NEGATIVO
33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POSITIVO
34	R	NR	NR	NR	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
35	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	POSITIVO
36*	R	-	NR	-	R	-	NR	-	NR	-	NR	NEGATIVO
37*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	R	POSITIVO
38	R	R	NR	RI	R	RI	NR	NR	NR	NR	NR	NEGATIVO
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	POSITIVO
40*	R	-	RI	-	R	-	R	-	R	-	R	POSITIVO
41*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-	POSITIVO
42*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-	POSITIVO
43*	R	-	R	-	R	-	R	-	R	-	-	POSITIVO

Dos 43 pacientes requisitados a comparecerem para a coleta de 2ª amostra, 12 ainda não retornaram (*)

¹ R= REAGENTE (> 10% cut off) / RI= REAGENTE INCONCLUSIVO (+/- 10% cut off) / NR=NÃO REAGENTE

² R quando DO ≥ cut off / NR quando DO < cut off

Como pode ser observado, 21 pacientes foram considerados positivos para a infecção por *T. cruzi*, o que representa 0,47% (21/4482) das doações do Hemopel nos anos de 2004-2005.

Analisando estes dados, verifica-se semelhança de infecção de *T. cruzi* com dados de outros serviços de hemoterapia do país, como 0,35% na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia em 2004 (FIGUEIREDO et al., 2005), mas também superioridade, visto infecção de 0,14% no Hemocentro de Ribeirão Preto (São Paulo) em 2004 (VALENTE et al., 2005). Já em doadores de sangue de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro e de Londrina, Paraná, a prevalência de infecção por *T. cruzi* foi superior à do Hemopel, 1,2 e 1,3%, respectivamente (SILVEIRA et al., 2003; BONAMETTI et al., 1998). Em Puebla, México, 1,24% estavam infectados por *T. cruzi* entre doadores de área rural e suburbana (MONTEÓN et al., 2005). Sánchez-Guillén et al (2002) apresentaram uma realidade um tanto mais alarmante em Puebla, México, com uma soroprevalência de 7,7% em doadores, mesmo sendo considerada uma área não endêmica.

Conforme também verificado na tab. 1, a reatividade das amostras variou entre as diferentes técnicas utilizadas, sendo que das 43 amostras inicialmente reativas para ELISA Chagatest, apenas 20, 18 e 18 apresentaram reatividade no ELISA Chagatek, HAI e IFI, respectivamente (fig. 3).

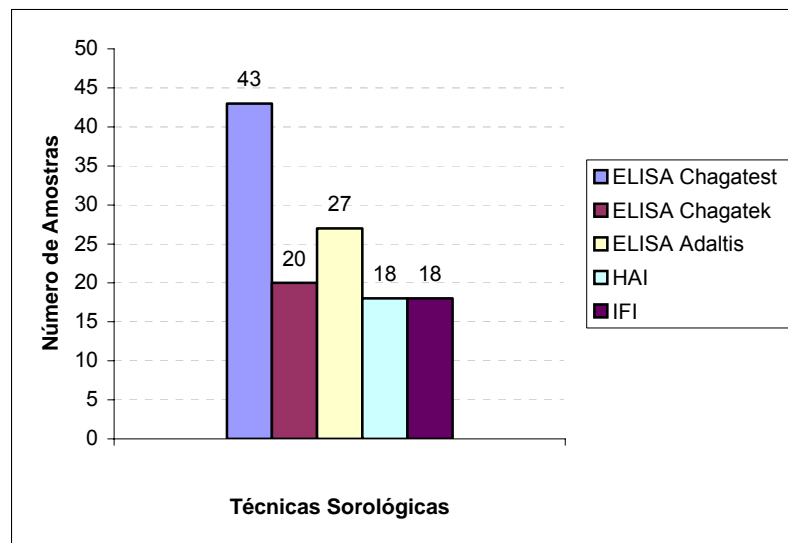


Figura 3 – Número de amostras reativas para *T. cruzi* nas diferentes técnicas sorológicas a partir das amostras com reatividade inicial na triagem sorológica dos doadores de sangue do Hemopel 2004-2005.

A fig. 4 apresenta os resultados de 23 amostras de soro analisadas no TESA-Blot, onde observa-se 11 positivas (1, 12, 14, 16, 20, 24, 33, 35, 37, 39 e 40), as quais reconhecem bandas de peso molecular de 150-160 kDa, 95 kDa e 120-210 kDa (*shed acute-phase antigen*), características para infecção por *T. cruzi*, segundo Umezawa (1996).



Figura 4 – TESA-Blot de 23 das 43 amostras de soro previamente reativas na triagem usando ELISA Chagatest. P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico.

Na fig. 5 estão os resultados de 2ª coleta em relação à triagem inicial das amostras reativas, após o processamento destas realizada pelo ELISA Chagatest, conforme rotina do Hemopel. É possível perceber que das 43 amostras inicialmente reativas, 12 ainda não retornaram para a nova coleta (27,9%), 18 confirmaram a reatividade (41,9%) e 13 reagentes inicialmente apresentaram um resultado não reagente na 2ª amostra (30,2%). Seis destes resultados de segunda coleta pelo Chagatest não coincidem com o resultado final derivado da análise das amostras por outras técnicas, sendo que, em cinco casos o resultado de 2ª amostra pelo ELISA Chagatest apresentou-se reagente e considerou-se o paciente não infectado e em um caso ocorreu a situação inversa. Com isso, fica claro que, para liberação de um resultado conclusivo ao doador, é adequado aliar outra(s) técnica(s) mesmo não sendo obrigatório. Quando iniciou-se a realização dos testes de imunofluorescência para este trabalho, as amostras de 2ª coleta do Hemopel passaram a ser analisadas por esta técnica, passando a constar o resultado das duas técnicas no laudo entregue ao paciente.

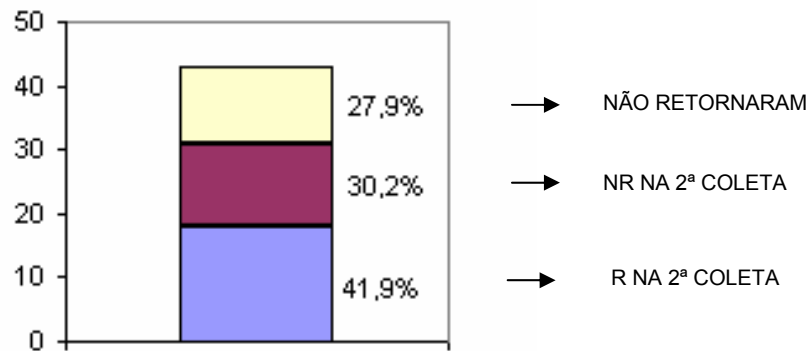


Figura 5 – Situação dos doadores que apresentaram reatividade inicial na triagem em relação à coleta de 2ª amostra, realizado pelo ELISA Chagatest.

Analisando estes resultados fica explícito que muitos fatores poderão interferir em reações e testes de diagnóstico, de modo a produzirem resultados diferentes. Isto pode estar relacionado a variáveis biológicas, presentes na amostras de sangue, ou a motivos técnicos, ou seja, devido ao material e/ou processos da análise. Referindo-se aos motivos biológicos, os resultados duvidosos ou falsamente positivos podem ser ocasionados por amostras inadequadas, como lipêmicas, ictéricas, hemolisadas ou por situações como reações cruzadas, especialmente com *Leishmania* spp., ou indivíduos em tratamento. Alguns cuidados para evitar estas interferências, como jejum, só podem ser solicitados na coleta de segunda amostra, visto que para a doação o indivíduo não pode estar sem alimentar-se. Por outro lado, existem muitas variáveis técnicas de produção e execução dos testes que contribuem para diferenças nos resultados. Na constituição/produção dos kits interferem, especialmente elementos antigênicos, como origem da cepa, forma evolutiva do parasito usada, qualidade e pureza do extrato (MOREL et al., 1980; CARNEIRO et al., 1991; SOUTO et al., 1996; FERNANDES et al., 1997; RUIZ-GARCIA et al., 2000; AÑEZ et al., 2004), além da forma de fixação do antígeno na placa, concentração e qualidade do conjugado, substrato e outros reativos. Na execução, outras variáveis como qualidade da água, preparação dos reagentes, lavagem e possíveis contaminações, bem como diferenças na metodologia e princípio dos métodos podem também interferir nos resultados finais.

A variabilidade antigênica apresentada entre as cepas de *T. cruzi* reforça a preocupação com a qualidade da triagem sorológica para esta doença, tanto que,

inicialmente, a legislação previa para os bancos de sangue a realização de duas técnicas sorológicas diferentes para a Doença de Chagas (Portaria 721/MS). Esta idéia é reforçada por Sánchez-Guillén et al. (2002), tanto para áreas endêmicas como não endêmicas. No entanto, a partir de dezembro de 2002, a RDC/ANVISA 343 reduz esta obrigatoriedade na pesquisa sorológica para Doença de Chagas, exigindo a utilização de um teste enzimático de alta sensibilidade, o que permanece vigorando, de acordo com a última RDC/ANVISA (153), publicada em 2004.

Quando da obrigatoriedade do uso de duas técnicas, os bancos de sangue utilizavam ELISA e Hemaglutinação como as técnicas de escolha. Atualmente, a técnica de ELISA parece ser adotada em todos, ou se não na maioria dos serviços de hemoterapia, pela qualidade do teste e possibilidade de automação do mesmo. A própria ANVISA/MS (2005) argumenta que para a triagem sorológica, ELISA é a metodologia de escolha, ficando a hemaglutinação como um 2º teste de triagem.

Entretanto, mesmo tendo a indicação do método de escolha para o uso na triagem sorológica, fica a dúvida de qual teste disponível no mercado deve ser escolhido, a partir dos resultados discordantes observados e dos fatores que estão envolvidos. Então, fica a critério de cada estabelecimento testar as técnicas, de acordo com a sua realidade, à procura da maior sensibilidade. Mesmo tendo constatado diversos casos de resultados falso-positivos, isto é mais conveniente que se soubesse de casos falso-negativos, o que não pôde ser verificado, já que os soros não reagentes pelo método usado na triagem não foram testados por outros métodos.

Desconsiderando questões relacionadas a custo, readequação das rotinas do banco de sangue e preocupação com outros agentes infectantes, muitos estudos defendem o uso de mais de uma técnica para uma triagem sorológica segura em bancos de sangue, ou pelo menos, julgam necessário nas localidades pesquisadas (SALLES et al., 1996; SAEZ-ALQUEZAR et al., 2000; SOBREIRA et al., 2001; GUTIERREZ et al., 2004)

Para analisar fatores que possam ser indicados de importância epidemiológica entre os casos considerados como positivos para Doença de Chagas no Hemopel, foram pesquisadas características destes indivíduos. Sabe-se, todavia, que estes fatores ficam dependentes do perfil dos doadores deste Hemocentro, já que todos os casos são extraídos do grande grupo. Para isso, foram verificadas

algumas características gerais, como sexo e idade que pudessem, mesmo que muito superficialmente, delimitar o grupo de pessoas que compõe esta amostra.

Tabela 2 – Perfil dos doadores do Hemopel quanto à idade e sexo em 2004-2005

Total de Doadores	Sexo(%)		Idade (%)	
	♂	♀	18-29 anos	>29 anos
4.482	66	34	43	57

valores aproximados

Na análise do perfil dos doadores de sangue do Hemopel (tab. 2) pode-se observar que 66% dos doadores foram homens e 34% mulheres. Contudo, quando foi avaliado o número de indivíduos positivos para Doença de Chagas, as mulheres estiveram em maior número (12/21).

Assim, como no Hemopel, a prevalência de Doença de Chagas em doadores de sangue do Hospital Independência, de Porto Alegre, foi maior na população feminina (ONSTEN et al., 2005). Contudo, esta situação difere de bancos de sangue de outras localidades, como Hemocentro de Sobral, Hemonúcleo de Santos e Nova Iguaçu (RJ), onde prevalece a Doença de Chagas entre doadores do sexo masculino (ALMEIDA et al., 2005; SANTOS et al., 2005; SILVEIRA et al., 2003). Já em doadores de sangue de zona rural e suburbana de Puebla, México, Monteón et al. (2005) não encontraram relação da infecção com o sexo.

Em relação à idade, entre os doadores do Hemopel confirmados como positivos para a Doença de Chagas a idade variou entre 20 e 60 anos, com uma média de 47,2 anos. Em Porto Alegre (Hospital Independência), foi semelhante à idade média (43,5 anos) dos casos reagentes para Doença de Chagas (ONSTEN et al., 2005), tendo sido constatado que a maioria dos doadores reagentes para esta doença estava acima da idade mediana. Da mesma forma, no Hemonúcleo de Santos (SP), a maioria dos casos de chagásicos detectados encontrava-se na faixa etária de 46-55 anos (SANTOS, et al., 2005) e em Nova Iguaçu (RJ), maiores de 40 anos (SILVEIRA et al., 2003), diferindo, porém, do Hemocentro Regional de Sobral (CE), onde a faixa etária predominante entre os doadores com reatividade para Chagas foi de 18-29 anos (ALMEIDA et al., 2005). Gonzalez et al. (2004) estudaram doadores de SP entre 18-20 anos de idade em 1995 e 2003 e observaram diminuição da prevalência de Doença de Chagas entre os doadores jovens. No curso natural, a Doença de Chagas acaba sendo diagnosticada em idades mais avançadas, quando começam a aparecer os sinais da doença crônica. Esses casos

diagnosticados em triagem sorológica são desconhecidos pelo portador e, por isso, são descobertos em qualquer idade, geralmente quando o indivíduo nem apresenta conseqüências clínicas da doença e, logo, ainda não recebeu assistência médica.

Os dados de escolaridade, também investigados nos indivíduos considerados infectados, demonstram que a ocorrência da Doença de Chagas no Hemopel coincidiu com o baixo nível de escolaridade, visto que acometeu dois analfabetos (9,5%), 14 com 1º grau incompleto (66,7%), dois com 1º grau completo (9,5%), um com 2º grau incompleto (4,8%) e dois com 2º grau completo (9,5%).

Outros dados do Hemopel foram pesquisados a fim de situar a Doença de Chagas no contexto da triagem sorológica deste Serviço de Hemoterapia. Desta forma, a fig. 6 apresenta o descarte de bolsas por bloqueio sorológico, devido a reatividade pelos parâmetros sorológicos pesquisados na triagem sangüínea.

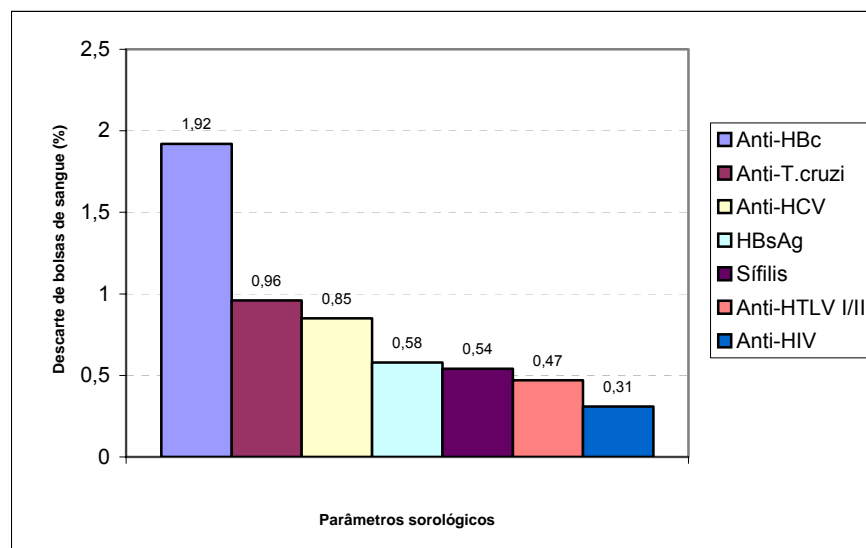


Figura 6 – Porcentagem de descarte de bolsas por bloqueio sorológico por diferentes agentes infecciosos na triagem sorológica do Hemopel, no período de 2004-2005.

A Doença de Chagas aparece como segundo motivo para o descarte de bolsas de sangue por reatividade na triagem sorológica, com um índice de 0,96% (43/4.482), assemelhando-se com a situação de outros centros de hemoterapia, como Hemocentro Regional de Sobral, Ceará, com um índice 0,93% das amostras com alguma reatividade para Doença de Chagas (ALMEIDA et al., 2005); e um pouco superior a outros, como diversos serviços hemoterápicos do estado de São Paulo com 0,31% de bolsas descartadas por reatividade para anti-*T.cruzi*

(FERNANDES et al., 2005); Serviço de Hemoterapia da Santa Casa de Limeria (São Paulo) com 0,23% de bloqueio sorológico por Chagas (DELLA PIAZZA et al., 2005). Em grande parte dos estabelecimentos de hemoterapia, a Doença de Chagas ocupa uma posição intermediária (3º, 4º ou 5º) de reatividade entre os parâmetros de triagem sorológica exigidos nos bancos de sangue, aparecendo o anti-HBc como o mais prevalente (CAPRA et al., 2005; JUCKOWSKY et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2005; VALENTE et al., 2005).

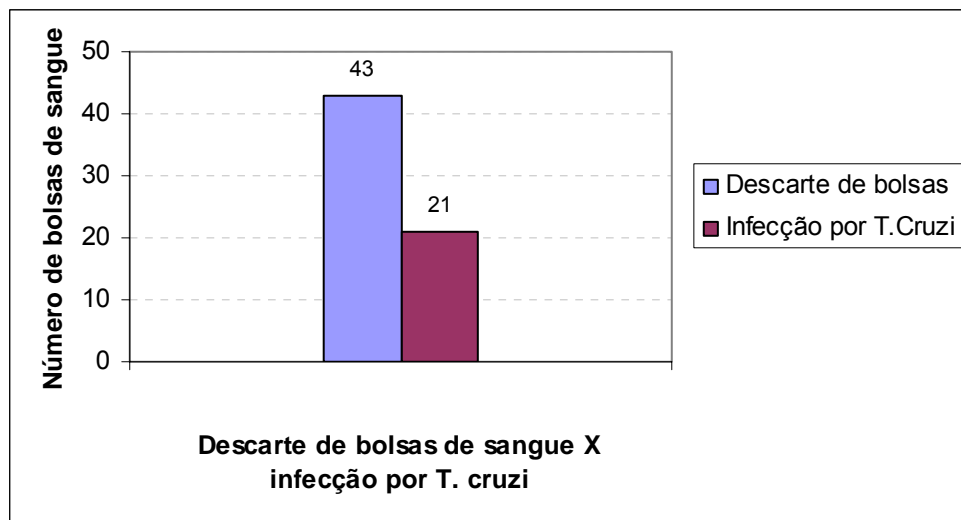


Figura 7 – Número de amostras reativas e positivas para *T. cruzi* em doadores do Hemopel no período de 2004-2005.

Conforme pode ser observado na fig. 7, o número de bolsas de sangue descartadas por reatividade para *T. cruzi* (43) é superior ao número de doadores positivos para Doença de Chagas (21). Este resultado deve-se a um cuidado especial com a qualidade do sangue. Qualquer reatividade apresentada pela amostra levará ao seu descarte, mesmo que na análise de segunda coleta esta reatividade não seja confirmada. Outra prática comum nos bancos de sangue é aumentar a zona cinza, ou seja, região em torno do limiar de reatividade onde considera-se o resultado inconclusivo. Em triagem sangüínea, a preocupação é com a sensibilidade, o que aumenta o número de casos falso-positivos, ao contrário de laboratórios de diagnóstico.

Conforme o instrumento utilizado na entrevista para triagem clínica de doadores, contendo itens que investigam a possibilidade de infecção do candidato

por *T. cruzi* (Anexo A) e, sabendo-se que “ Os candidatos com história de terem sido picados por Triatomíneo ou com diagnóstico clínico ou laboratorial de doença de Chagas devem ser excluídos de forma permanente” (RDC/ANVISA 153/2004), foi avaliada a situação de inaptidão de doação pela Doença de Chagas na triagem clínica dos candidatos à doação. Concordando com a maioria dos relatórios, no Hemocentro Regional de Pelotas, foi detectado que nenhum dos candidatos à doação foi impedido por estar relacionado à Doença de Chagas. Mesmo assim, casos de Chagas foram confirmados, demonstrando um total desconhecimento dos doadores de estarem infectados por *T. cruzi*. A Doença de Chagas geralmente não aparece como causa de inaptidão na triagem clínica da maioria dos bancos de sangue, provavelmente porque os portadores da doença estejam informados da impossibilidade de doarem sangue, a menos que o impedimento apareça pela informação de contato com o vetor, que pode não ser de conhecimento da pessoa a sua relação com a doença. Analisando resultados de diversos serviços de hemoterapia, a inaptidão por Doença de Chagas na triagem clínica foi descrita por um Serviço de Hemoterapia de Goiás, sendo 0,3% do total de 2.543 inaptos de janeiro de 2004 a julho de 2005 (LONGATTI et al, 2005).

Cabe ressaltar que a existência de portadores desinformados dificulta o controle da doença e fenômenos como o êxodo rural também contribuem para que muitos indivíduos na fase crônica assintomática tornem-se fontes disseminadoras de *T. cruzi* em centros urbanos através da doação de sangue. Isto faz com que a via transfusional seja uma forma de transmissão importante para a Doença de Chagas, podendo superar a transmissão vetorial, a qual restringe-se a áreas onde encontra-se o vetor. Na realidade do Hemopel é agravante o fato de doadores de cidades vizinhas, consideradas áreas endêmicas, serem trazidos regularmente para repor sangue enviado para hospitais destes locais. Dentre os doadores infectados do Hemopel parece relevante citar o seu local de origem, já que pelos dados observados, estes coincidem com regiões consideradas endêmicas para a Doença de Chagas (BARUFFA e ALCÂNTARA FILHO, 1985), sendo a maioria (10/21) natural de Canguçu, um (1/21) de Pelotas e os outros de demais cidades do interior como São Lourenço (3/21), Santana da Boa Vista (2/21), Pinheiro Machado (2/21), São Francisco de Assis (1/21), Encruzilhada do Sul (1/21) e Piratini (1/21). Já os dados de residência atual não se mostraram significativos.

Logo, é visto que a transmissão transfusional permite a expansão da doença para áreas não endêmicas e o estabelecimento destas formas de transmissão permite a permanência do protozoário no meio. Assim, acredita-se que o controle da Doença de Chagas deverá estar relacionado com procedimentos que envolvam as mais diversas formas em que *T. cruzi* possa ser transmitido. Tendo em vista que em zonas urbanas destaca-se a transmissão não-vetorial, pela ausência do vetor, outras vias, como a transfusional, devem receber maior atenção, considerando-se essencial uma triagem sangüínea cuidadosa nos candidatos à doação.

De tudo isso, é possível traçar estratégia de controle relacionada à transmissão de *T. cruzi* por transfusão sangüínea, com uma triagem clínica consciente, obtendo doadores sem comportamento de risco, história conhecida e sem relação com fontes de aquisição da doença; uma triagem sorológica cuidadosa, utilizando testes seguros e sensíveis e, por último, atentando-se para o uso racional do sangue e hemoderivados, pois embora tenha-se todos estes cuidados o risco de transmissão pelo sangue não é nulo, visto a existência da janela imunológica e possíveis falhas no processo de obtenção de hemocomponentes aptos ao uso.

CONCLUSÕES

- O número de doadores reativos para *T. cruzi* pelo Chagatest ELISA é maior (43) do que os soropositivos por este hemoparasito (21) entre doadores de sangue do Hemopel em 2004-2005.
- Considerando o resultado do TESA-Blot como padrão para diagnóstico, a técnica utilizada para triagem de doadores do Hemopel no período de 2004-2005 apresenta resultados falso-positivos, gerando descarte de unidades de bolsas não infectadas por *T. cruzi*.
- A Doença de Chagas foi a segunda causa de descarte de bolsas de sangue no Hemopel (0,96%) no período de 2004-2005.
- Os casos positivos para Doença de Chagas do Hemopel 2004-2005 são mais frequentes em mulheres, indivíduos com escolaridade de 1º grau incompleto, sendo a maioria (47,6%) natural de Canguçu e a faixa etária média de 47,2 anos.
- Ocorre o desconhecimento da infecção por *T. cruzi* entre doadores de sangue do Hemopel detectados com a Doença de Chagas no período 2004-2005.
- Para o diagnóstico de certeza da infecção por *T. cruzi* existe a necessidade de utilização de mais de uma técnica.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças no Sangue**. 1 ed. 2 reimp. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC/ANVISA) nº 153**. Brasília, 14 jun. 2004.

ALMEIDA, C.E.; VINHAES, M.C.; ALMEIDA, J.R. DE; SILVEIRA, A.C.; COSTA, J. Monitoring the Domiciliary and Peridomiciliary Invasion Process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.95, n.6, p.761-768, 2000.

ALMEIDA, J.M.M.F.; PARENTE, R.M.M.; PONTE, F.L.R.; PARENTE, J.G.M.; CUNHA, M.S.P.; CARNEIRO, L.F.G.M.; GOMES, F.V.B.F.; PITOMBEIRA, M.H.; SANTOS, J.R.P.D. Perfil dos doadores não-negativos para reação de triagem anti-*Trypanosoma cruzi* no Hemocentro Regional de Sobral – CE. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v. 27, supl. 2, p. 320, 2005.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F.M. da; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.SD.; PAMÍREZ, J.L.; TEIXEIRA, M.M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Trop. Med. Int. Health**. v.9, n.12, p.1319- 1326, 2004.

BARUFFA, G. e ALCÂNTARA FILHO, A. Inquérito sorológico e entomológico da infecção pelo *T. cruzi* na região sul do Rio Grande do Sul. **Ann. Soc. Belge Med. Trop**. v.65, suppl.1, p.171-179, 1985.

BONAMETTI, A.M.; CASTELO FILHO, A.; RAMOS, L.R.; CAMARGO, E.D.; NAKAMURA, P.M.; BALDY, J.L. DA S.; MATSUO, T. Soroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in students at the seven-fourteen age range, Londrina, PR, Brazil, in 1995. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.93, n.6, p.727-732, 1998.

BRACHO, C.G.; GARCÍA, L.G.; VERDUGO, J.F.; MARTÍNEZ, S.G.; COSME, M.T.; MELGAR, C.R.; CASTREJÓN, O.V. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. **Rev. Panam. Salud. Publica.** v.4, n.2, p.94-99, 1998.

BRASHEAR, R.J. ET AL. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. I. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. **Transfusion.** v.35, n.3, p.213-218, 1995.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.86, n.4, p.387-393, 1991.

CAPRA, M.S; SOUZA, S.R.; SANTOS, A.P.; CORREA, C.; SOARES, A.; OLIVEIRA, B.R.; RIBAS, J.; PETERSEN, V.; BRUM, D.E.; MARISON, M. Características das doações realizadas no Serviço de Hemoterapia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre/RS. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl. 2, p.259, 2005.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACEDO, V. Influência da parasitemia na evolução da doença de chagas crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.1, p.1-6, 2005.

DELLA PIAZZA, F.J.D.P.; CESTARI, L.F.O.C.; OLIVEIRA, T.F.O.; FERAZ, L.R.F. Perfil de bloqueios sorológicos dos doadores de sangue no serviço de Hemoterapia da Santa Casa de Limeira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.270, 2005.

DE PAULA, E.V.; GONÇALVES, N.S.L.; XUEREF, S.; ADDAS-CARVALHO, M.; GILLI, S.C.O.; ANGERAMI, R.N.; VERÍSSIMO, M.P.; GONÇALVES JR., F.L. Prevalence of transfusion-transmitted Chagas disease among multitransfused patients in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.26, supl.2, p.280, 2004.

FERNANDES, M.F.A.; SOUSA, L.B.C.; MONTEIRO, M.C.; BOTEAGA, R.L.C. Inaptidão clínica e sorológica de doadores de sangue do estado de São Paulo em 2003. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.267, 2005.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL, P.G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from Chronic Chagasic Patients, Triatomines and Opossums Naturally Infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.92, n.3, p.343-351, 1997.

- FIGUEIREDO, V.M.; ROMEO, M.; CIRCUNCISÃO, D.A.; MELLO, A.B. Positividade dos marcadores sorológicos da Fundação Hemoba. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.333, 2005.
- GONÇALEZ, T.; ALMEIDA NETO, C.; SALLES, N.; SABINO, E.; CHAMONE, D. Chagas disease prevalence and risk factors among first time blood donors at age 18 to 20 in São Paulo/Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.26, supl.2, p.275-276, 2004.
- GUTIERREZ, R.; ANGULO, V.M.; TARAZONA, Z.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. **Parasitology**, v.129, n.4, p.439-444, 2004.
- JUCKOWSKY, C.A.; PIRES, M.C.; FLORES, M.E.C.; GARCIA, C.A.; FARINON, J.; FARINON, J.; MARQUES PEREIRA, J.P. Impacto do voto de auto-exclusão confidencial na triagem sorológica dos doadores de sangue no Serviço de Hemoterapia do HCPA-RS. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.266, 2005.
- KERNDT, P.R.; WASKIN, H.A.; KIRCHHOFF, L.V.; STEURER, F.; WATERMAN, S.H.; NELSON, J.M.; GELLERT, G.A.; SHULMAN I.A. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, Califórnia, Brazil. **Transfusion**. v.31, n.9, p.814-818, 1991.
- LONGATTI, S.; ABREU, C.; BARIANI, W.; BARIANI, C.; CÂNDIDA, C.; FLORENTINO, A.; CRISPIM, A.; SILVA, L.; MAGALHÃES, V. Perfil dos candidatos a doação de sangue e plaquetas do Serviço de Hemoterapia do Hospital Araújo Jorge. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p. 270-271, 2005.
- MONTÉON, V.M.; REYES-LÓPEZ, P.A.; SOSA-PALACIO, A.; LEÓN-TELLO, G.; MARTÍNEZ-MURQUÍA, J.; SOSA-JURADO, F. Distribución heterogénea de la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en Puebla, México. **Salud Publica Mex.** v.47, n.1, p.116-125, 2005.
- MORAES-SOUZA, H.; BORDIN, J.O.; BARDOSSY, L.; MAC PHERSON, D.W.; BLAJCHMAN, M.A. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. **Transfusion**. v.35, n.9, p.723-726, 1995.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.77, n.11, p.6810-6814, 1980.

ONSTEN, T.G.H.; DUTRA, I.; MARAFON, J.; FASSINA, K.; ALMEIDA, A.C.C.; PONCELET, K.; CAPRA, M. Análise de uma população de doadores com sorologia reagente: idade significativamente mais alta nos doadores com marcadores para Chagas e Lues comparados com doadores reagentes para vírus. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.325, 2005.

PONCE, C.; PONCE, E.; VINELLI, E.; MONTOYA, A.; AGUILAR, V. DE; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; RANGEL-ALDÃO, R.; LEVIN, M.J.; ESFANDIARI, J.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O.; SILVEIRA, J.F. da. Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. **J. Clin. Microbiol.** v.43, n.10, p.5065-6058, 2005.

RABELLO, A.; LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, E.F.; GADELHA, M.F.; SANTOS, J.A. DOS; MELO, L. DE; SCHWIND, P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay – ID-PaGIA Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, n.1, p.77-82, 1999.

RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; PIANETTI, G.M.; RABELO, R.M.; BORDIN, J.O.; MORAES-SOUZA, H. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi* – infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. **Transfusion.** v.35, n.3, p.226-230, 1995.

RUIZ-GARCIA, M.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.O.; ANGARITA, L.; ALVAREZ, D. Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. **Heredity.** v.85, n.4, p.318- 327, 2000.

SABINO, E.C.; GONÇALEZ, T.T.; SALLES, N.A.; SILVA, G.R.; CHAMONE D.F. Trends in the prevalence of Chagas' disease among first-time blood donors in São Paulo, Brazil. **Transfusion.** v.43, n.7, p.853-856, 2003.

SAEZ-ALQUÉZAR, A.; SABINO, E.C.; SALLES, N.; CHAMONE, D.F.; HULSTAERT, F.; POTTEL, H.; STOOPS, E.; SERRÍN, M. Serological Confirmation of Chagas' Disease by a Recombinant and Peptide Antigen Line Immunoassay: INNO-LIA Chagas. **J. Clinical Microbiol.** v. 38, n.2, p.851-854, 2000.

SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; BARRETO, C.C.; BARRETO, A.M.E., OTAN, M.M.; Chamone, D.F. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. **Rev. Panam. Salud Publica.** v.13, n.2/3, p.111-115, 2003.

SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; CLIQUET, M.G.; ELUF-NETO, J.; MAYER, A.; ALMEIDA-NETO, C.; MENDONÇA, M.C.; DORLIACH-LLACER, P.; CHAMONE, D.F.; SAEZ-ALQUEZAR, A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. **Transfusion**. v.36, n.11-12, p.969-973, 1996.

SANCHÉZ-GUILLÉN. M.C.; BARNABÉ, C.; JUEGAN, J.F.; TIBAYRENC, M.; VELÁSQUEZ-ROJAS, M.; MARTÍNEZ-MUNGUÍA, J.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; ROSAS-RAMÍREZ, M.; PÉREZ-FUENTES, R. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non endemic area of Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.97, n.7, p.947-952, 2002.

SANTOS, R.M.; COSTA, R.O.; D'AVILA, F.S.; SILVA, D.C.; MATSUDA, C.L.V.; PATAVINO, G. Perfil dos doadores com sorologia não reativa para anti-HIV, anti-HTLV, D. Chagas e Sífilis, atendidos no Hemonúcleo de Santos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v.27, supl.2, p.332, 2005.

SCHMUNIS, G.A.; ZICKER, F.; PINHEIRO, F.; BRANDLING-BENNETT, D. Risk for Transfusion-Transmitted Infectious Diseases in Central and South America. **Emerg. Infect. Dis**. v.4, n.1, p.5-11, 1998.

SILVEIRA, A.C. e VINHAES, M.C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.94, n.1, p.405-411, 1999.

SILVEIRA, H.J.; MOZART, O.N.; NORBERG, A.N.; PILE, E.A. *Trypanosoma cruzi* prevalence and clinical forms in blood donor candidates in Brasil. **Rev. Saúde Pública**. v.37, n.6, p.807-809, 2003.

SOBREIRA, A.C. de M.; GOMES, F.V.B.A.F.; SILVA, M.A.M. da; OLIVEIRA, M. de F. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Iguatu, CE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.34, n.2, p.193-196, 2001.

SOUSSUMI, L.M.T.; COVAS, D.T.; PASSOS, A.D.C. Positividade para a Doença de Chagas entre doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v.26, supl.2, p.280, 2004.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v.83, n.2, p.141-152, 1996.

UMEZAWA, E.S. NASCIMENTO, M.S.; KESPER JR., N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, n.9, p.2143-2147, 1996.

VALENTE, V.B.; DE BIASE, R.R.; ÂNGULO, I.L.; UBIALI, E.M.A.; COVAS, D.T. Estudo da reatividade dos marcadores sorológicos em doadores e doações no Hemocentro de Ribeirão Preto - 2004. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27, supl.2, p.331, 2005.

WENDEL, S.; SHIKANAI YASUDA, M.A.; SILVA, G.R. Spatial statistics analysis from rejected blood units for Chagas disease in Brazil: Application of spatial continuous analysis and geostatistical tools. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.26, supl.2, p.282, 2004.

ZAVISION, B.; PEREIRA, M.; JORGE, M.M; SEREBRYANIK, D.; MATHER, T.N.; CHAPMAN, J.; MILLER, N.J.; ALFORD, B.; BZIK, D.J.; PURMAL, A. Inactivation of protozoan parasites in red blood cells using INACTINE PEN110 chemistry. **Transfusion.** v.44, n.5, p.731-738, 2004.

ARTIGO 2

INVESTIGAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL*

RESUMO

A via congênita constitui-se uma das formas de infecção por *T. cruzi*, especialmente importante em áreas de baixa endemicidade. Visando avaliar este meio de transmissão, foram analisadas 351 amostras de soro de cordão umbilical de recém-nascidos de Pelotas (RS) e região de parturientes admitidas em três hospitais de Pelotas. Utilizando o método de ELISA, foi encontrada uma amostra com sorologia reagente, sendo a parturiente identificada como agricultora, 34 anos e moradora da zona rural de Pelotas. Após consentimento, foi coletada nova amostra de soro da mãe e de todos os membros residentes na mesma casa. A sorologia da mãe foi reagente em três técnicas de ELISA, HAI, IFI IgG e TESA-Blot, enquanto a amostra de soro do recém-nascido foi reagente nas mesmas técnicas e não reagente para IFI IgM. Os outros membros da família analisados apresentaram sorologia não reagente. Embora não tenha-se detectado pelas técnicas utilizadas, a princípio, a transmissão para o recém-nascido, sugere-se incluir investigação da doença no pré-natal de gestantes residentes ou provenientes de áreas endêmicas.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Transmissão congênita. Doença de Chagas.

ARTICLE 2

INVESTIGATION OF CONGENITAL CHAGAS DISEASES IN THE SOUTHERN OF RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL *

ABSTRACT

The congenital pathway represents one of the infection forms by *T.cruzi* especially important in low endemicity areas. To evaluate these transmission pathway 351 umbilical cord serum samples of newborns from Pelotas (RS) and region admitted in the three Pelotas hospitals were analyzed. By the ELISA test, one sample show serological reactivity (0,28%) and the mother was identified as a farmer, 34 years old and living at the rural area of Pelotas. After the consent, a sample was collected from the mother and all the resident member os the house. The mother was serological reactive in three techniques ELISA, Indirect Hemogalutination (IH), Indirect Immunoglobulin G Immunofluorescence (IgG IIF) and TESA-blot. The sample of the newborn was serological reactive to the same techniques and non reactive to IgM IIF. The others family members analyzed were non serological reactive. Although congenital transmission was not detected, the prenatal investigation of the Chagas disease of pregnant women living in this area or from the endemic areas is suggested.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Congenital transmission. Chagas disease

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, embora conhecida desde 1909, ainda constitui uma preocupação para a saúde pública no Brasil.

Muitas são as formas de transmissão desta doença, sendo de maior importância através do vetor e transfusional. Entretanto outras, como a congênita, têm ocorrido em pacientes parasitados por *T. cruzi*, como verificado por Streiger et al. (1995) em 341 recém-nascidos de mães soropositivas de Santa Fé, Argentina, onde a incidência de infecção transplacentária foi detectada em 2,64%, sugerindo um meio de transmissão importante em áreas de baixa endemicidade. Schenone et al. (2001) relatam infecção congênita em duas gerações no Chile, onde foi detectado o protozoário em dois recém-nascidos filhos de duas mães irmãs infectadas, estas também filhas de mãe infectada. Gürtler et al. (2003) verificaram ocorrência de 1136 casos de *T. cruzi* congênitos de 1994 a 2001 a partir de dados do Ministério da Saúde da Argentina.

Em alguns casos, a transmissão maternal é identificada, porém, não sendo possível detectar se ocorreu por via transplacentária ou transmamária. Busca retrospectiva realizada por Rassi et al. (2004) em 145 mães soropositivas com doença crônica, demonstrou dois casos positivos em 278 filhos (0,7%), sem conhecimento se a infecção ocorreu na gestação ou aleitamento, fato também destacado por Zaidenberg (1999), na Argentina, onde foram registrados 102 casos entre recém-nascidos e lactantes no período de 1980 a 1997. Quanto à amamentação por mães infectadas, segundo Rassi et al. (2004), não se deve proibir o aleitamento natural, exceto quando a mãe estiver em fase aguda ou com sangramento mamilar. Porém, Ferreira et al. (2003) testaram o tratamento térmico do leite em forno microondas e concluíram ser um processo simples e eficaz para inativação das formas tripomastigotas, podendo ser executado em ambiente doméstico.

Algumas alterações podem ser observadas na placenta e anexos de mães infectadas, além do encontro de formas amastigotas. Moretti et al. (2005) detectaram formas amastigotas e focos de necrose nas vilosidades coriônicas, com posterior fibrose e calcificações, e também observaram alterações granulomatosas e infiltrados inflamatórios, ao tempo que Nisida et al. (1999) analisaram os casos em que houve infecção transplacentária e localizaram amastigotas na placenta, decídua, vilosidades e cordão umbilical.

Moretti et al. (2005) reportaram que para tratamento de gestantes com infecção chagásica aguda faz-se necessária discussão médica para cada caso, visto não ser possível administração de antiparasíticos específicos durante a gravidez.

Relatos das conseqüências clínicas para os recém-nascidos de mães chagásicas são assinalados por alguns autores. De 71 crianças com Doença de Chagas congênita, 64,8% (46) não apresentaram sinais clínicos, enquanto que em 18,3% o sinal mais freqüente foi a hepatomegalia (FREIJI e ALTCHER, 1995). Bittencourt et al. (1984) mostraram positividade em exames parasitológicos para Doença de Chagas em criança de cinco meses de idade, que apresentava-se mal nutrido e com megaesôfago, sendo que imediatamente após o nascimento havia apresentado disfagia, vômitos e regurgitação. Blanco et al. (2000) também relataram alguns destes problemas, além de prematuridade, hipóxia perinatal, esplenomegalia, falência cardíaca, meningoencefalite e morte, enquanto Nisida et al. (1999) descreveram um aborto espontâneo e mortalidade no período neonatal causada pela infecção congênita por *T. cruzi*. Examinando dois recém-nascidos infectados, observaram, em um deles, anemia, síndrome do desconforto respiratório e ataques, tendo morrido com 10 horas de vida, enquanto no outro, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite, miocardite e anemia, com morte aos 30 dias.

A investigação de transmissão congênita, mais freqüentemente, pode ser efetuada pela pesquisa do parasita no sangue do recém-nascido, ou através de testes sorológicos. Freiji e Altchek (1995) indicam a pesquisa de *T. cruzi* no sangue pelo microhematócrito para diagnóstico em crianças menores de seis meses, enquanto para crianças com idade superior a esta, devem ser usados dois métodos sorológicos. Nisida et al. (1995) indicaram, além do microhematócrito, o QBC (*quantitative buffy coat* ou xenodiagnóstico artificial) como métodos adequados para estes casos. Em alguns casos a detecção de anticorpos não é possível e apenas a observação do parasito no sangue possibilita o diagnóstico (NISIDA et al., 1999). O

período da gestação em que ocorreu a infecção pode ser justificativa para a presença ou não de anticorpos no recém-nascido, como por exemplo, numa transmissão ocorrida no final da gestação, a pesquisa de anticorpos, inicialmente negativa, poderá positivar-se em próximas análises (LORCA et al., 1995). No caso de métodos sorológicos, é necessário especificar o tipo de anticorpos detectados, já que anticorpos da classe IgG são capazes de atravessar a barreira placentária e há enorme possibilidade de serem estes da mãe quando detectados nos recém-nascidos. Num estudo em recém-nascidos (RN) de mães infectadas, em Santiago, Chile, todos apresentaram altos títulos de IgG, mesmo no grupo onde não ocorreu infecção (LORCA et al., 1995). O acompanhamento dos níveis de anticorpos da classe IgG poderá auxiliar na identificação de infecção, pois estes aumentam ou mantem-se em casos de doença, ou diminuem gradualmente, caso tenham sido passados pela mãe. Nisida et al. (1999) perceberam concordância entre os níveis de IgG das mães chagásicas crônicas e seus recém-nascidos, sugerindo a transferência destes anticorpos via placentária. No diagnóstico sorológico da transmissão congênita a pesquisa de anticorpos da classe de imunoglobulina IgM é mais indicada, visto estes não poderem ser passados de mãe para filho pela barreira placentária (LORCA et al., 1995). Já Reyes et al. (1990) detectaram anticorpos das classes IgM e IgG em RN congenitamente infectados na Argentina e, pelo uso de painel de antígenos recombinantes, foi possível identificar IgG possivelmente recebidos da mãe, e outros que foram detectadas só nos RN, sendo a maioria específicas contra um antígeno de fase aguda da doença (SAPA), enquanto nos RN não infectados, não foram observadas IgM e IgG específicas. As amostras de soro de RN congenitamente infectados mostraram-se indubitavelmente todas positivas para IgM e IgG no *imunoblot* usando antígenos de secreção e excreção de tripomastigotas (TESA), enquanto apresentaram alguns resultados duvidosos ou não-reativos, quando utilizado o ELISA com extratos alcalinos de epimastigota (UMEZAWA et al., 1996). Considerando uma variedade de possibilidades para diagnóstico, o uso de diversos métodos parasitológicos, histopatológicos e imunohistoquímicos incrementam a possibilidade de diagnóstico da Doença de Chagas (NISIDA et al., 1999).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar transmissão congênita por *T. cruzi* na região de Pelotas.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência de anticorpos anti-*T. cruzi* em amostra de soro de cordão umbilical em recém-nascidos de parturientes de Pelotas e região.
- Verificar a ocorrência de infecção congênita em filhos de mães sororreativas através da pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos recém-nascidos.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Participaram do estudo 351 parturientes residentes em Pelotas e região admitidas no Hospital-Escola da FM/UFPEL, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Pelotas e Hospital São Francisco de Paula e seus respectivos recém-nascidos. Todas as participantes assinaram termo de consentimento para coleta do material e utilização em estudo.

3.2 Coleta das amostras

Foram coletados aproximadamente 3mL de sangue do cordão umbilical de todos os recém nascidos vivos. Após etiquetagem adequada, as amostras foram encaminhadas ao laboratório para separação da alíquota de soro, a qual ficou congelada em temperatura de -20°C até sua análise.

3.3 Pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

ELISA

As amostras de soro de cordão umbilical foram analisadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas utilizando o *kit* de enzimmunoensaio CHAGATEST® (Wiener lab., Argentina), disponibilizado para comercialização, com metodologia própria. Este *kit* apresenta adsorvidos na microplaca os antígenos recombinantes Ag1, Ag2, Ag 13, Ag 30, Ag 36 e Ag SAPA, sendo este último da forma tripomastigota do parasito, forma circulante no indivíduo infectado.

Descrição da técnica: Adição de 200µl de diluente de amostras (albumina bovina em solução fisiológica tamponada com tampão fosfato pH 7,2). Adição de

10µl de amostras e controles negativos e positivos. Homogeneização. Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5 X) com solução de lavagem preparada da diluição de uma parte de cloreto de sódio 1,4mmol/L em tampão fosfato 100mmol/L e tensoativo não iônico 0,1g/L em quatro partes de água destilada. Adição de 50µl de conjugado, composto de anti-imunoglobulina humana, produzida em cabra, conjugada com peroxidase. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (5X). Adição de 100 µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio 60mmol/L em tampão citrato 50mmol/L pH 3,2 com tetrametilbenzidina (TMB) 0,01mmol/L em ácido clorídrico 0,1N. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 18-25°C. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em leitor de ELISA a 450nm.

Cálculo do *cut off*: média dos controles negativos + 0,300

As leituras em densidade óptica foram transformadas em logaritmo para apresentação gráfica dos resultados.

3.4 Confirmação de amostra(s) reagente(s)

Todas as amostras que apresentaram absorvância até 10% inferior ao *cut off* e igual ou superior a este foram novamente analisadas pelo método de ELISA. Em caso positivo, foi rastreado o endereço da parturiente para visita, orientação sobre a realização do estudo e da necessidade de coleta de amostras para confirmação de exames. Após consentimento por escrito, foi coletada amostra de todos os membros da família e residentes na casa. Estas amostras foram novamente testadas pelo método de ELISA descrito, por outras duas marcas disponibilizadas no mercado: CHAGATEK® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e ALKA EIAgen *Trypanosoma cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália), além de hemaglutinação indireta - HAI (CHAGATEST HAI® – screening A-V – Wiener lab, Argentina), imunofluorescência indireta - IFI (IMUNOCRUIZI® - biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) e TESA-Blot (UMEZAWA et al., 1996), todas com metodologia própria.

3.4.1 ELISA CHAGATEK® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Os testes com este *kit* foram realizados manualmente no Laboratório de Sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas, havendo-se utilizado o aparelho apenas para a leitura final da placa.

Descrição da técnica: Adição de 200µL de diluente da amostra em cada cavidade (solução protéica base PBS estabilizada). Adição de 10µl de amostras e controles negativos e positivos. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X) com solução de lavagem preparada da diluição de uma parte de tampão fosfato concentrado em 24 partes de água destilada. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:10 de anticorpo monoclonal anti-IgG humana marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X). Adição de 100µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio com tetrametilbenzidina (TMB). Homogeneização. Incubação por 10 minutos a 20-25°C ao abrigo da luz. A reação é interrompida pela adição de 100µl de ácido sulfúrico 1mol/L e a leitura realizada em 450nm, utilizando ar como branco.

Cálculo do *cut off* : média dos controles negativos + 0,100

Interpretação do teste: uma amostra é considerada não reativa se sua DO é inferior ao valor do *cut off*, ao tempo que será considerada reativa se sua DO é igual ou superior ao valor do *cut off*.

3.4.2 ELISA EIAgen *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália)

O *kit* imunoenzimático EIAgen *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália), comercializado com metodologia própria, como visto na sua identificação, é destinado para a determinação de anticorpos de classes IgG e IgM em soro ou plasma humanos. A análise das amostras por este *kit* foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia e Centro de Biotecnologia, na Universidade Federal de Pelotas.

Descrição da Técnica: Diluição da amostra na proporção de 1:101 (10µl de soro em 1mL de diluente – solução protéica contendo detergente, estabilizantes protéicos e preservativos). Adição de 100µl de soro diluído e controles positivo e negativo nas cavidades da microplaca, reservando a cavidade A1 para o branco de amostra. Incubação por 60 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera) com solução preparada a partir de tampão 25X concentrado, contendo imidazole, Tween 20 e preservativo. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:20 de anticorpo específico anti-IgG&M marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica tamponada.

Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera). Adição de 100µl da solução substrato, composta de mistura estabilizada de TMB e água oxigenada, pronta para uso. Incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Adição de solução de parada (ácido sulfúrico 0,3M), seguida de homogeneização. Leitura em comprimento de onda de 450nm em até 60 minutos, zerando com a cavidade A1.

Cálculo do *cut off* : média dos controles negativos + 0,200

Interpretação do teste: amostras com valor de densidade óptica menor que o *cut off* são classificadas como negativas, enquanto amostras com valor maior que o *cut off* são consideradas positivas para os anticorpos anti-*T.cruzi*.

3.4.3 HEMAGLUTINAÇÃO - CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina)

A técnica de hemaglutinação indireta foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas utilizando *kit* CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina), com metodologia própria, o qual utiliza-se de hemáceas de aves sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de membrana de *T. cruzi* para produzir aglutinação em presença de anticorpos específicos.

Descrição da técnica: Diluição da amostras e controles 1/40 (10µL de amostra e controles em 400µL de diluente, composto de solução protéica em tampão). Adição de 50µL das diluições de amostras e controles em nas cavidades da microplaca de fundo em V. Adição de 25µL de antígeno nas cavidades. Mistura aplicando batidas suaves durante, no mínimo, 30 segundos. Repouso por 60 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de vibrações. Leitura visual: considerando-se não reativo quando há presença de um sedimento em forma de botão nítido e uniforme no fundo da cavidade; reativo fraco quando visto um manto pequeno no fundo da cavidade com botão definido no centro e fortemente reativo quando verificada formação de um filme ou manto de contornos irregulares no fundo da cavidade.

Em caso de amostras que apresentaram reatividade, mesmo que fraca, foi realizada a prova quantitativa, de mesma metodologia, porém realizando-se diluições seriadas do soro na placa. O título considerado corresponde à maior diluição de soro reativo.

Valor de referência indicado: com alerta de que este valor seja em termos de probabilidade, a indicação é de que consideram-se presumivelmente parasitados os indivíduos cujos soros são reativos com títulos maiores ou iguais a 1/40.

3.4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - IMUNOCRUIZ[®] (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Preparo das lâminas:

As lâminas foram preparadas com fixação de antígeno de *T.cruzi* obtido por cultivo em meio de LIT, sob a forma de epimastigota, comercializado pela biolab-Mérieux (Imunocruzi[®]). A fixação do antígeno foi procedida conforme descrição do fabricante. As lâminas foram armazenadas em freezer -20°C para uso posterior.

Titulação do conjugado:

Sendo o título do conjugado variável para cada lote e devendo adequar-se em função dos reagentes e equipamentos usados, seguindo especificações do fabricante, foi estipulado o título a ser diluído o conjugado para análise das amostras. O conjugado utilizado foi antigamaglobulina de carneiro anti IgG humana marcada pelo isotiocianato de fluoresceína, FLUOLINE[®] (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil).

Solução reveladora:

De acordo com especificação da técnica, usou-se azul de Evans em solução estoque de 10%, sendo esta diluída a 1% na hora de preparar o conjugado para uso.

A cada bateria de testes era retirada a quantidade de lâminas necessária do congelador, secadas a temperatura ambiente e identificadas para uso.

As amostras selecionadas para análise eram diluídas em PBS usando como base os resultados prévios do ELISA para o número de diluições a serem realizadas inicialmente para cada amostra. Caso não fosse suficiente, a amostra era submetida a análise novamente na próxima bateria de testes com um número maior de diluições.

Descrição da técnica: Adição de 20µl de cada diluição de soro por área. Incubação a 37°C/30 min em câmara úmida. Lavagem 2X /5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Adição de 20µl de conjugado em diluição pré-estabelecida preparado na hora do uso. Incubação a 37°C/30 min em câmara úmida. Lavagem 2X/5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Montagem para leitura com glicerina tamponada e lamínula. Observação em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40x.

Interpretação do teste: reação positiva era considerada quando observada fluorescência verde brilhante periférica ou por toda superfície dos protozoários e reação negativa quando os parasitos apresentavam cor vermelha ou coloração verde fosca.

A cada bateria de testes a reação era controlada por dois controles positivos e dois controles negativos.

3.4.5 TESA – BLOT

O Imunoblot com antígeno TESA (antígeno de excreção e secreção de *T. cruzi*) foi aplicado em amostras que apresentavam resultados discordantes entre as técnicas, resultando em uma sorologia duvidosa.

As membranas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram gentilmente cedidas pela Dra. Eufrosina Umezawa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, acompanhadas de protocolo de realização da técnica e padrões positivos para análise dos resultados.

Conforme descrito por Umezawa et al. (1996), o TESA é obtido do sobrenadante da cultura de células LLC-MK₂ infectadas com cepa Y de *T. cruzi*.

As membranas contendo antígenos e bloqueadas com PBS pH 7,2 contendo leite em pó desnatado 5% foram cortadas em tiras de 0,4cm e incubadas com soro diluído 1:150 em PBS 7,2 com 1% leite por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, foram lavadas quatro vezes por cinco minutos em tampão PBS 7,2. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®), diluído 1:3000 em PBS 7,2 com leite 1% por 2 horas, sob agitação constante em temperatura ambiente. Novamente foram lavadas e cobertas por solução reveladora contendo 4-cloro-naphtol e água oxigenada em

metanol e PBS 7,2 até que as bandas aparecessem. Para interrupção da reação, foram lavadas em água destilada e secas em papel filtro para posterior análise das bandas, comparando com tira positiva para soro padrão.

Segundo padrão de diagnóstico, amostras IgG positivas para *T. cruzi* reagem com banda de 150-160kDa. Vários pacientes de fase crônica também reagem com bandas SAPA (*shed acute-phase antigen*) de PM que varia de 120-210 kDa e uma banda de aproximadamente 95kDa.

Amostras com resultado duvidoso foram repetidas em concentração de 1:100.

A técnica de TESA-Blot foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por ELISA das 351 amostras de soro de cordão umbilical mostrou um caso positivo (0,28%), sendo a única amostra que apresentou densidade óptica bem superior ao limiar de reatividade na leitura do ELISA (DO amostra = 2500/ *cut off* = 0,303). As outras 350 amostras analisadas apresentaram leituras com valores bem abaixo do limiar, variando de zero a 0,192, sem nem estarem incluídos na zona cinza, calculada em $\pm 10\%$ do *cut off* (fig. 1).

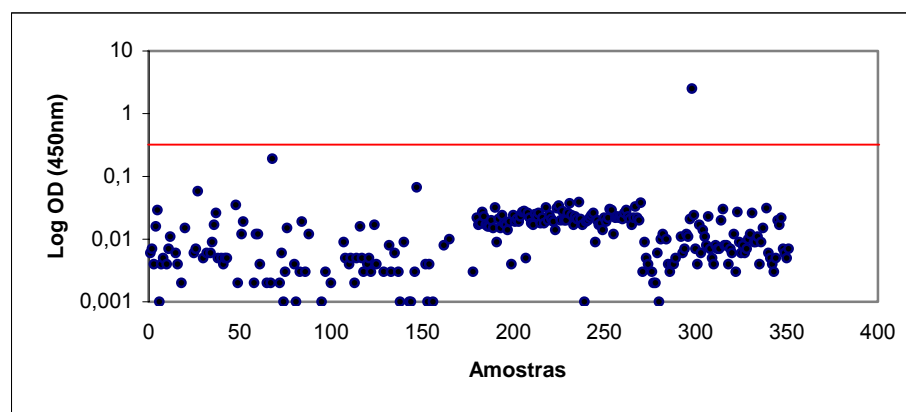


Figura 1 – Logaritmo dos valores de densidade óptica (450 nm) obtidos na leitura do ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em amostras de soro de cordão umbilical. A linha horizontal representa o *cut off*.

Foi rastreada a origem da amostra sororreativa, e após consentimento, foram coletadas amostras de todos os membros da família residentes na casa da parturiente. Esta foi identificada como agricultora, 34 anos e moradora da Colônia Ramos, Cerrito Alegre, zona rural de Pelotas, RS. Em análise do sangue dos familiares residentes na mesma casa, a sorologia reagente foi confirmada em ELISA para a parturiente e sua criança. Na pesquisa de anticorpos por IFI, detectou-se IgG na parturiente com título de 1:160 e, em sua criança, IgG título 1:40 e não reagente para IgM, portanto, não confirmando, a princípio, a transmissão da infecção da mãe para a criança. Na tab. 1 podem ser observados os resultados das amostras de soro de mãe e filha em diversas técnicas sorológicas. Ressalta-se que a criança tinha três meses de idade e não foi

realizado um acompanhamento posterior do caso e sabe-se da possibilidade de aparecimento de anticorpos próprios em um período mais longo (LORCA et al., 1995; BLANCO et al., 2000).

Tabela 1 – Resultados das diversas técnicas de sorodiagnósticos para o soro de mãe sororreativa na triagem e sua criança

	ELISA CHAGATEST®	ELISA CHAGATEK®	ELISA ADALTIS	HAI	IFI (IgG)	IFI (IgM)	TESA-Blot
Mãe	R	R	R	R	R (1:160)	X	POS
Criança	R	R	R	R	R (1:40)	NR	POS

R= REAGENTE, NR= NÃO REAGENTE, X= não realizado, POS= POSITIVO

Na fig. 2 observa-se o perfil de reatividade dos soros de mãe e criança pelo TESA-Blot. O soro da mãe reconheceu bandas de 150-160kDa, 95kDa e conjunto de bandas de 120-210kDa, referente a bandas SAPA (*shed acute-phase antigen*). O soro da filha apresentou o mesmo perfil de bandas, porém reagindo fracamente.

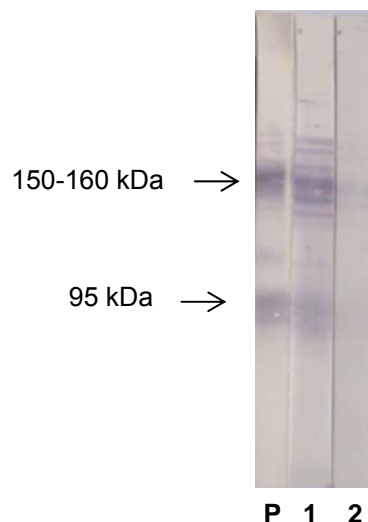


Figura 2 – Perfil de pesos moleculares reconhecidos pelos anticorpos da mãe (1) e criança (2) no TESA-Blot. P representa a tira com soro padrão chagásico positivo.

Assim como neste estudo, em Arequipa, Peru, igualmente zona endêmica, Mendonza Ticona et al. (2005) não detectaram casos de transmissão congênita em nenhum dos recém-nascidos de mães infectadas. Também observaram um baixo número de gestantes parasitadas (0,73%), superior ao verificado na região de Pelotas (0,28%). Por outro lado, Streiger et al. (1995) relatam soropositividade de 14,62% para *T. cruzi* em gestantes de Santa Fé, Argentina, com uma infecção transplacentária de 2,64% dos recém-nascidos. Novamente na Argentina, Blanco et al (2000) detectaram

infecção congênita em 7,1 % (26 casos) dos recém-nascidos de mães sororreativas. Também Azogue e Darras (1991) demonstraram alta frequência de infecção congênita em Santa Cruz, Bolívia, detectando *T. cruzi* em 3,29% de 820 recém-nascidos com menos de 2,5Kg. No Brasil, São Paulo, a ocorrência de infecção congênita de mães chagásicas crônicas foi de 5,17% (3/58) (NISIDA et al., 1999). Reyes et al. (1990) descreveram ocorrência de 45,4% na Argentina, onde 10, dos 22 recém-nascidos, estavam congenitalmente infectados por *T. cruzi*.

Alguns fatores podem ser relacionados com a transmissão do protozoário durante a gestação. Sanchez Negrette et al. (2005) relataram associação significativa do baixo peso e prematuridade com os recém-nascidos infectados. Hermann et al. (2004) mostraram relação da infecção congênita com alta carga parasitária das mães e uma resposta imunológica periférica deficiente (monócitos e células T menos ativados e menor produção de interferon gama específico), comparando-se com mães chagásicas de filhos que não se infectaram na gestação. Além disso, Moretti et al. (2005) sugeriram que o período de infecção da mãe durante a gestação pode representar um fator importante para ocorrência da transmissão congênita. A co-infecção com o HIV merece cuidados ainda maiores, pois poderá reativar a doença e também potencializar o risco de transmissão congênita e mortalidade perinatal (FREIJI e ALTCHER, 1995; NISIDA et al., 1999).

Procurando identificar forma de infecção para este caso, segundo relato da paciente, não houve contato com o vetor, mas sim, a realização de diversas transfusões sanguíneas durante a infância. No entanto, tendo ocorrido há muitos anos atrás não foi possível acesso aos registros de transfusão para investigação mais detalhada. Destaca-se o desconhecimento da parturiente em ser portadora da doença, embora soubesse da existência da mesma, inclusive citando casos de conhecidos. Os portadores desinformados constituem um fator limitante para o controle da doença. Além disso, as formas de transmissão não vetoriais permitem a disseminação da doença para áreas não endêmicas, sendo importante mencionar como agravante para esta situação a migração de pessoas infectadas de áreas endêmicas da zona rural para as cidades.

Notificou-se o caso à Secretaria Municipal de Saúde e, como de rotina, foi realizada a investigação entomológica na residência e anexos, apresentando-se ambos negativos para triatomíneos adultos, ninfas e ovos.

O que parece claro é que mães portadoras de *T. cruzi* não necessariamente geram filhos infectados, mesmo que, conforme Moretti et al (2005), sejam encontradas formas amastigotas na placenta. No entanto, a congênita certamente constitui-se uma das vias de transmissão da Doença de Chagas. Neste sentido, poderia ser relevante incluir investigação da doença no pré-natal de gestantes residentes ou provenientes de áreas endêmicas, o que representa ser útil, visto que muitas mães gestantes nunca realizaram exames para Doença de Chagas e desconhecem se são portadoras ou não. Nisida et al. (1999) estudaram 58 gestantes chagásicas crônicas, sendo que destas, 42 foram diagnosticadas nos exames pré-natais.

Muitos casos de transmissão congênita devem ocorrer sem conhecimento dos envolvidos, gerando portadores desinformados. Para isto, o que poderia ser feito, conforme estudo de Rassi et al. (2004), é a pesquisa sorológica em filhos vivos de mães chagásicas crônicas quando estas são detectadas.

CONCLUSÕES

- O encontro de soropositividade para *T. cruzi* entre as gestantes da região de Pelotas, RS, indica possibilidade de transmissão de Doença de Chagas por via congênita nesta região.
- Mães chagásicas crônicas não geram, necessariamente, filhos com a doença.
- Ocorre o desconhecimento de gestantes da região de Pelotas, RS, em estarem infectadas por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

AZOGUE, E. e DARRAS, C. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas em recién nascidos com infección placentária por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.24, n.2, p.105-109, 1991.

BITTENCOURT, A.L.; VIEIRA, G.O.; TAVARES, H.C.; MOTA, E.; MAGUIRE, J. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. Report of case with Megaesophagus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.33, n.1, p.30-33, 1984.

BLANCO, S.B.; SEGURA, E.L.; CURA, E.N.; CHUIT, R.; TULIÁN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GÜRTLER, R.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. **Trop. Med. Int. Health.** v.5, n.4, p.293-301, 2000.

FERREIRA, C.S.; AMATO NETO, V.; GAKIYAI, E. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.45, n.1, p. 41-42, 2003.

FREIJI, H. e ALTCHER, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin. Infect. Dis.** v.21, n.3, p.551-555, 1995.

GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerg. Infect. Dis.** v.9, n.1, p.29-35, 2003.

HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEJA, C.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. **J. Infect Dis.** v.189, n.7, p.1274-1281, 2004.

LORCA, M.; VELOSO, C.; MUNOZ, P.; BEHAMONDE, M.I.; GARCIA, A. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in Congenital Chagas Disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.52, n.6, p.512-515, 1995.

MENDOZA TICONA, C.A.; CORDOVA BENZAQUEN, E.; ANCCA JUAREZ, J.; SALDANA DIAZ, J.; TORRERS CHOQUE, A.; VELÁSQUEZ TALAVERA, R.; DE LOS RIOS ALVAREZ, J.; SALDANA DIAZ, J.; VEJA CHIRINOS, S.; SANCHEZ PEREZ, R. The prevalence of Chagas disease in puerperal women and congenital transmission in an endemic area of Peru. **Rev. Panam. Salud Publica.** v.17, n.3, p.147-153, 2005.

MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; PAEZ, M.C.; CHAUL, M.; BARBIERI, G.; FEIJOO, D.C.; SARTORI, M.J.; PAEZ, R.C. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.1, p.53-55, 2005.

NISIDA, I.V.V.; AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; DUARTE, M.I.S.; UMEZAWA, E.S. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three Health Institutions in São Paulo City, Brazil. **Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo.** v.41, n.5, p.305-311, 1999.

RASSI, A.; AMATO NETO, V.; RASSI, G.G.; AMATO, V.S.; RASSI JR, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, S.G. Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.37, n.6, p.485-489, 2004.

REYES, M.B.; LORCA, M.; MUÑOZ, P.; FRASCH, A.C. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** v.87, n.7, p.2846-2850, 1990.

SANCHEZ NEGRETTE, O.; MORA, M.C.; BASOMBRIO, M.A. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infections and family clustering in Salta, Argentina. **Pediatrics.** v.115, n.6, p.668-672, 2005.

SCHENONE, H.; GAGGERO, M.; SAPUNAR, J.; CONTRERAS, M.C.; ROJAS, A. Congenital Chagas Disease of Second Generation in Santiago, Chile. Report of Two cases. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.43, n.4, p.231-232, 2001.
STREIGER, M.; FABBRO, D.; DEL BARCO, M.; BELTRAMINO, R.; BOVERO, N. Chagas congénito en la ciudad de Santa Fé. Diagnóstico y tratamiento. **Medicina (Buenos Aires).** 55(2):125-132, 1995.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER JR, N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v.34, n.9, p.2143-2147, 1996.

UMEZAWA, E.S. NASCIMENTO, M.S.; KESPER JR., N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, n.9, p.2143-2147, 1996.

ZAIDENBERG, M. La enfermedad de Chagas congenita en la Provincia de Salta, Argentina, años 1980-1997. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.32, n.6, p.689-695, 1999.

ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DE TRÊS ELISAs, HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA, IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E TESA-BLOT NO SORODIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

RESUMO

A pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro pode ser realizada por diversas técnicas para o diagnóstico da Doença de Chagas, sendo que cada técnica apresenta características particulares e os resultados obtidos entre elas poderá apresentar variações. Com o intuito de comparar diferentes técnicas disponíveis para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, foram analisadas 161 amostras que apresentaram reatividade em técnicas de diagnóstico para pesquisa de anti-*T. cruzi*. Foram avaliadas três marcas de ELISA disponíveis no mercado, um *kit* de hemaglutinação indireta e outro de imunofluorescência indireta. Amostras com resultados discordantes entre as técnicas e um grupo de amostras reativas em todos os testes foram analisados também pelo TESA-Blot, método confirmatório para a sorologia convencional. Das 161 amostras, 65,84% apresentaram concordância nos resultados das diferentes técnicas utilizadas, sendo em todas estas reagentes. Nas demais (34,16%) houve discordância no resultado de pelo menos uma das técnicas. Considerando apenas os ELISAs, constatou-se co-positividade entre as três técnicas em 123 amostras (76,4%). A IFI discordou isoladamente das outras técnicas em 10 amostras (6,21%) e o mesmo ocorreu com a HAI em apenas uma (0,62%). O TESA-Blot foi sempre positivo quando analisadas amostras reagentes em todas as técnicas, detectando bandas de 150-160 kDa, 95kDa e também, em algumas amostras, conjunto de bandas de 120-210kDa (SAPA). Nas amostras reagentes em apenas um ou dois ELISAS, o TESA-Blot foi negativo, com exceção de uma amostra. Quando analisadas as amostras reagentes nos três ELISAs e não reagentes na IFI, o TESA-Blot confirmou a positividade. No grupo de amostras reagentes nos ELISAs e não reagentes na HAI e IFI, 50 % foram negativas no TESA-Blot e 50% fracamente positivas. Com base nos resultados do TESA-Blot foi verificado que a IFI foi a técnica com maior número de resultados falso-negativos e um dos ELISAs com maior número de resultados falso-positivos. A partir dos dados obtidos neste estudo, ficou

evidente a discordância entre resultados de diferentes técnicas sorológicas para a Doença de Chagas, sendo necessário conhecer as características particulares de cada técnica, buscando associar mais de uma técnica para definição do diagnóstico sorológico desta parasitose.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Diagnóstico sorológico. Imunofluorescência indireta. Hemaglutinação indireta. ELISA indireto. TESA-Blot.

ARTICLE 3

EVALUATION OF THREE ELISA KITS, INDIRECT HEMOAGGLUTINATION, INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE AND TESA-BLOT IN THE SERUMDIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE

ABSTRACT

The search for antibodies anti-*T.cruzi* in the serum can be performed by several techniques for Chagas diseases diagnosis, each technique shows particular characteristics and the obtained results could present variation. This study compares different available techniques to the serological diagnosis to Chagas diseases, 161 samples which present reactivity in diagnosis techniques to research the antibodies anti-*T.cruzi* were analyzed. Three trademarks of ELISA kits available at the market, one kit for Indirect hemoagglutination and other for Indirect immunofluorescence were analyzed. Samples which show disagreement results between the techniques and a group of reactive samples were analyzed by TESA-Blot technique, to prove the conventional serology. 65,84% of the samples presents agreement between the results obtained by the different techniques, being reactive in all employed techniques. 34,16% of the samples show disagreement in the obtained results at list in one of the employed techniques. Considering only the ELISAs, co-positivity between the three kits in 123 samples (76,4%). By the IIF 10 (6,21%) samples isolated disagree to the others techniques. The same behavior was showed by the IH in one sample (0,62%). The TESA-Blot was always positive when the reactive samples in the others techniques were analyzed, detecting bands of 150-160 kDa, 95kDa and also, in same samples, a band group of 120-210 kDa (SAPA). In the reactive samples in one or two ELISA kits, the TESA-Blot was negative, with the exception of one sample. The reactive samples at the three ELISAs and IH and non reactive at the IIF, the TESA-Blot confirms the positivity. In the reactive sample group at the ELISAs and non reactive at IH and IIF, 50% were negative in TESA-Blot and 50% weakly positive. Based on the TESA-Blot results the IIF was the technique which shows the grater number of false negatives and one of the ELISAs kit shows the grater number of false positives. From the data obtained in this study, became evident the disagreement between the results obtained by different serological techniques

used by Chagas disease diagnosis, being necessary to know the particular characteristics of each techniques, searching the association of more than one technique to define the serological diagnosis of this parasitosis.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Serological diagnosis. Indirect immunofluorescence. Indirect Hemoagglutination. Indirect ELISA. TESA-Blot.

INTRODUÇÃO

A presença do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente da Doença de Chagas, vem sendo, ao longo dos anos, diagnosticada no homem utilizando-se diferentes metodologias. O diagnóstico de suspeita parte de um exame clínico, o qual engloba uma anamnese com relatos sintomatológicos, histórico relacionado com fatores de risco para a transmissão do parasita e observação dos sinais clínicos. Estes poderão ser característicos, como sinal de Romaña e chagoma de inoculação ou indeterminados, como febre, fraqueza, cefaléias, dores no corpo, de fase aguda, ou ainda sintomas relacionados a alterações cardíacas, do sistema digestório ou outras, relacionadas a um quadro crônico. A partir de suspeita da Doença de Chagas, quer por desenvolvimento de sintomas, pesquisas epidemiológica ou triagem, serão utilizadas técnicas de diagnóstico específicas para esta doença.

O diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas por métodos sorológicos destina-se à pesquisa de anticorpos produzidos contra *T. cruzi*. Brener e Andrade (1979) e Lana e Tafuri (2000) relacionam neste grupo: reação de precipitação, reação de imunofluorescência indireta (IFI), reação de ELISA (enzime linked immunosorbent-assay), reação de fixação do complemento (FC), reação de hemaglutinação indireta (HAI), lise mediada por complemento (LMCo) e pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos (AATV).

A reação de fixação de complemento, no momento em desuso como método de diagnóstico, foi a primeira técnica utilizada para pesquisa de anti-*T. cruzi* na triagem de bancos de sangue. Kerndt et al. (1991) citaram a utilização da fixação do complemento na seleção de doadores de sangue na Califórnia, EUA. Schattschneider et al. (1992) utilizaram além da IFI e do ELISA, fixação do complemento e aglutinação em látex em pesquisa sorológica de chagásicos crônicos e agudos. Aglutinação em látex, IFI e ELISA identificaram 81% dos casos agudos, enquanto a fixação do complemento não mostrou potencial diagnóstico para esta fase da doença. Para os casos de fase crônica, a fixação do complemento

apresentou sensibilidade de 69%, comparando com 100% para as outras três técnicas.

Muitos estudos destinam-se a comparar o comportamento das técnicas frente a um painel de amostras. Na avaliação de três ELISAs para IgG, dois deles demonstraram 100% de concordância, sensibilidade e especificidade, enquanto o outro obteve 94,6% de concordância, 100% de sensibilidade e 93% de especificidade (MALAN et al., 2006). Blejer et al. (1999) calcularam especificidade e sensibilidade de técnica de ELISA e HAI observando especificidade maior na HAI que no ELISA (99,8% e 99,3% respectivamente) e o contrário na sensibilidade (100% no ELISA e 74,93% na HAI).

Pirard et al. (2005) aplicaram IFI, duas HAIs e quatro ELISAs na análise de 396 amostras, verificando concordância de resultados não reagentes em 47,7% (189/396) das amostras e 33,3% (132/396) nos resultados reagentes em todas as técnicas. Nas outras 75 amostras (18,9%), houve discordância de no mínimo uma das técnicas. A sensibilidade e especificidade encontradas para os ELISAs variou de 98,6 a 100% e 95,3 a 98,9%, respectivamente. Já a IFI, apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 96,3%, enquanto as HAIs variaram a sensibilidade de 96,5 a 97,5% e a especificidade de 87 a 93,9%.

Da mesma forma, Gutierrez et al. (2004) também dedicaram-se na comparação de quatro técnicas sorológicas para Doença de Chagas: IFI, ELISA usando lisado total de cepa Y e ELISA com dois antígenos recombinantes. Partindo dos resultados de ELISA usando lisado total de cepa local, selecionaram 94 amostras sororreagentes e 90 soro não reagentes e observaram que 79/94 (84%) foram reagentes em todos os testes. Isoladamente, a IFI concordou com o ELISA de cepa local na positividade de 84 amostras (89,45%), enquanto o ELISA com antígenos recombinantes e o ELISA de cepa Y foram positivos em 80/94 (85,1%) e 79/94 (84%) amostras, respectivamente.

Mesmo que os métodos sorológicos baseiem-se na pesquisa de anticorpos específicos contra *T.cruzi*, muitas vezes ocorrem algumas reações inespecíficas causadoras de resultados falso-positivos ou inconclusivos, como ocorre com anticorpos produzidos por pacientes com leishmaniose (SCHATTSCHEIDER et al., 1992; TEIXEIRA et al., 1994; PALACIOS et al., 2000, UMEZAWA et al., 2001). Com o intuito de aumentar a especificidade das técnicas sorológicas, estudos avaliaram o uso de antígenos que apresentem menor número de reações cruzadas,

especialmente com soros positivos para leishmaniose. O antígeno TESA (antígeno de excreção e secreção de tripomastigotas) apresenta maior especificidade quando comparado com extrato antigênico de epimastigota (UMEZAWA et al., 2001).

Umezawa et al. (2001) descreveram ELISA usando antígenos de excreção e secreção de tripomastigotas de *T.cruzi* (TESA-ELISA). Avaliando seu uso em 284 amostras incluindo pacientes chagásicos de fase aguda e crônica, pacientes não chagásicos e pacientes com outras doenças, incluindo leishmaniose, demonstrou 100% de sensibilidade. O TESA-ELISA detectou IgG em 100% dos soros de pacientes agudos e crônicos, ou seja, apresentou alta reatividade independente da fase de infecção. Apresentou também alta especificidade, reagindo com apenas 4 dos 53 soros de pacientes com leishmaniose. Berrizbeitia et al. (2006) também avaliaram ELISA usando antígeno TESA em controles positivos para Doença de Chagas, controles negativos e soros positivos para outras doenças, sendo verificado 100% sensibilidade e 94% de especificidade, com reações cruzadas com leishmaniose. Para aumentar a especificidade, as proteínas foram purificadas por imunocromatografia, aumentando a especificidade para 100%, porém reduzindo para 98,6% a sensibilidade. Ainda, Nakazawa et al. (2001) descrevem o TESA-ELISA com alta sensibilidade e especificidade.

Outra alternativa apresentada para aumentar a especificidade é a utilização de antígenos recombinantes na pesquisa sorológica de anticorpos anti-*T.cruzi*. Carvalho et al. (1993), quando utilizaram antígenos recombinantes, não observaram reações cruzadas com soros positivos para outras doenças.

Telles et al. (2003) utilizaram a ubiquitina de *T. cruzi* purificada no diagnóstico diferencial de Doença de Chagas e Leishmaniose. No teste de 104 amostras de chagásicos crônicos, o uso de ubiquitina mostrou 98% de sensibilidade, além de alta especificidade, reagindo com apenas 5/70 amostras de painel de soros positivos para leishmaniose, com melhor desempenho quando comparado com proteínas recombinantes de extrato total de epimastigota.

Muitas destas técnicas estão disponíveis no mercado na forma de *kits*, com metodologia já padronizada e prontos para uso, ou poderão ser produzidas e padronizadas em laboratórios de pesquisa. A forma parasitária e origem da cepa utilizados no teste para a produção dos antígenos podem interferir no desempenho do teste. Em muitos testes, são usados antígenos da forma epimastigota, o que diminui a sensibilidade para Doença de Chagas, já que a forma circulante no

hospedeiro vertebrado é a tripomastigota e, também a especificidade, pois o uso de antígenos de formas amastigotas, podem diminuir a, favorecendo reação cruzada, por exemplo, com pacientes infectados com *Leishmania* sp., que também apresentam esta forma parasitária. Reações cruzadas com soros de pacientes com leishmaniose são as mais conhecidas nas pesquisas sorológicas de anti-*T. cruzi*. (SCHATTSCHEIDER et al., 1992; TEIXEIRA et al., 1994; PALACIOS et al., 2000; SÁNCHEZ et al., 2001; GUALBERTO et al., 2005). Também entre as formas epimastigota e amastigota, há diferenças antigênicas, haja visto que as frações imunodominantes de antígenos de uma e outra não são as mesmas (UMEZAWA et al., 2001).

A comparação de três técnicas de ELISA usando antígenos das formas amastigota, epimastigota e tripomastigota em amostras de grupos positivos e negativos para Doença de Chagas e grupo com outras parasitoses, demonstrou 100% de sensibilidade para todos e moderada especificidade, sendo esta, respectivamente, 97,6, 98,3 e 99,3% (BERRIZBIETIA et al., 2004). A sensibilidade e especificidade de ELISA usando extrato antigênico de epimastigota foram menores quando comparadas com TESA-ELISA (UMEZAWA et al., 2001). ELISA por quimioluminescência apresentou maior especificidade quando utilizou antígeno purificado de tripomastigota, quando comparado com complexo antigênico de epimastigota (ALMEIDA et al., 1997).

ELISA por quimioluminescência usando antígeno de tripomastigota purificado e complexo antigênico de epimastigota demonstrou sensibilidade de 100% para ambos e especificidades de 100 e 99,7% com antígenos de tripomastigota e epimastigota, respectivamente, mostrando-se altamente sensível e específico para ser usado em bancos de sangue e monitoramento de pacientes submetidos à quimioterapia (ALMEIDA et al., 1997).

Quanto à origem da cepa utilizada, Gutierrez et al (2004), na Colômbia, utilizando antígenos de diferentes origens no imunodiagnóstico da Doença de Chagas, obtiveram os melhores resultados foram obtidos com antígenos de cepas locais de *T. cruzi*. No México, também Sánchez et al. (2001) verificaram que a técnica de ELISA com antígenos de cepas locais foi mais sensível do que ELISA com extratos antigênicos de cepas da Argentina para detectar indivíduos na fase indeterminada da doença. O mesmo foi detectado comparando ELISA utilizando cepas locais da Colômbia e ELISA comercial, visto que o primeiro teve um índice de concordância

com os resultados da IFI de 0,93, enquanto a concordância com o segundo foi de 0,43 (ENCISO et al., 2004).

Alguns testes confirmatórios têm sido descritos para resolverem situações duvidosas na sorologia convencional. Umezawa et al. (1996) propuseram o uso do TESA na técnica de imunoblot. Na avaliação do método, todas as amostras de Chagas agudo e congênito mostraram positividade para IgM e IgG e os casos crônicos também foram positivos 100% para IgG. Além disso, não foram detectadas reações cruzadas com soros de não chagásicos portadores de outras doenças, inclusive leishmaniose. Maior especificidade pode ser encontrada utilizando-se o antígeno TESA no Blot do que no ELISA, visto que, em 53 amostras de pacientes com leishmaniose, nenhuma delas reagiu no TESA-Blot, enquanto quatro delas reagiram no TESA-ELISA (UMEZAWA et al., 2001). Segundo Umezawa et al. (1996) TESA-Blot é considerado positivo quando amostras reagem com antígenos de 130 a 200kDa e/ou com antígenos de 150-160kDa, além do soro de alguns pacientes também reconhecerem bandas de 80-120kDa. Também para Nakazawa et al. (2001), fração de 150-170kDa do TESA é relevante no diagnóstico da Doença de Chagas.

Saez-Alquézar et al. (2000) avaliaram INNO-LIA Chagas (line immunoassay), o qual apresentou 99,4% de sensibilidade e 98,1% de especificidade. Trata-se de um teste usando sete antígenos recombinantes e sintéticos cobrindo uma membrana de *nylon*, a qual é incubada com o soro e o resultado é observado pela intensidade das bandas visualizadas, comparadas às bandas produzidas pelos soros controles de diferentes reatividades.

Frente a esta variedade de opções para uso na detecção da Doença de Chagas, é necessário o conhecimento real da aplicabilidade e desempenho de cada uma das técnicas isoladamente e em conjunto com outras, a fim de obter-se altos níveis de sensibilidade e especificidade, adequados ao período da doença.

OBJETIVOS

- Comparar a sororreatividade para *T. cruzi* no sorodiagnóstico da Doença de Chagas através de Imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, três diferentes *kits* de ELISA disponíveis no mercado e TESA-Blot.
- Conhecer o perfil de bandas reconhecidas por soros reativos quando analisados pelo TESA-Blot.
- Avaliar técnicas sorológicas (ELISA Chagatest, ELISA Chagatek, ELISA Adaltis, HAI e IFI) utilizadas no diagnóstico da Doença de Chagas.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para este estudo foram selecionadas amostras inconclusivas ou reagentes em alguma das técnicas em estudo, sendo 84 provenientes do Laboratório de Sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas, RS e 77 do Laboratório Central de Diagnóstico de Porto Alegre, RS (LACEN-FEPPS).

As amostras permaneceram armazenadas em freezer a -20°C , sendo descongeladas no momento do uso.

3.2 Pesquisa sorológica de anticorpos anti-*T.cruzi*

3.2.1 ELISA 1 - CHAGATEST® (Wiener lab, Argentina)

O processamento das amostras pelo kit CHAGATEST® (Wiener lab, Argentina), disponibilizado no mercado com metodologia própria, foi realizado no Laboratório de Sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas através de automação. Este *kit* apresenta adsorvidos na microplaca os antígenos recombinantes Ag1, Ag2, Ag 13, Ag 30, Ag 36 e Ag SAPA, sendo este último da forma tripomastigota do parasito, forma circulante no indivíduo infectado.

Descrição da técnica: Adição de 200µl de diluente de amostras (albumina bovina em solução fisiológica tamponada com tampão fosfato pH 7,2) em cada uma das cavidades da microplaca e de 10µl de amostras e controles negativos e positivos, seguido de homogeneização. Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5X) com solução de lavagem preparada da diluição de uma parte de cloreto de sódio 1,4mmol/L em tampão fosfato 100mmol/L e tensoativo não iônico 0,1g/L em 4 partes de água destilada. Adição de 50µl de conjugado, composto de anti-imunoglobulina humana, produzida em cabra, conjugada com peroxidase. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (5X). Adição de 100µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio 60 mmol/L em tampão citrato

50mmol/L pH 3,2 com tetrametilbenzidina (TMB) 0,01mmol/L em ácido clorídrico 0,1N. Incubação por 20 minutos a 18-25°C. A reação é interrompida pela adição de 50µl de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em 450nm.

Cálculo do *cut off* média dos controles negativos + 0,300

Interpretação do teste: são consideradas amostras não reativas aquelas com densidades ópticas (DO) menores que o limite inferior da zona de indeterminação; amostras reativas aquelas com DO maiores que o limite superior da zona de indeterminação e amostras indeterminadas aquelas com DO dentro da zona de indeterminação. A zona de indeterminação compreende valores $\pm 10\%$ *cut off*.

Para controle da reação foram utilizados controles positivos e negativos do próprio *kit*, assim como controles próprios preparados por diluição a partir de um *pool* de soros positivos em um *pool* de soros negativos de amostras provenientes da rotina do laboratório de sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas. Quando os controles não estavam de acordo com os parâmetros esperados, o teste era repetido em todas as amostras daquela bateria.

3.2.2 ELISA 2 - CHAGATEK® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Os testes com este *kit* foram realizados manualmente no Laboratório de Sorologia do Hemocentro Regional de Pelotas, havendo-se utilizado o aparelho apenas para a leitura final da placa.

Descrição da técnica: Adição de 200µL de diluente da amostra em cada cavidade (solução protéica base PBS estabilizada). Adição de 10µl de amostras e controles negativos e positivos. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X) com solução de lavagem preparada da diluição de uma parte de tampão fosfato concentrado em 24 partes de água destilada. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:10 de anticorpo monoclonal anti-IgG humana marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica. Homogeneização. Incubação por 20 minutos a 37°C. Lavagem (6X). Adição de 100µl de substrato, sendo este preparado de uma mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio com tetrametilbenzidina (TMB). Homogeneização. Incubação por 10 minutos a 20-25°C ao abrigo da luz. A reação é interrompida pela adição de 100µl de ácido sulfúrico 1mol/L e a leitura realizada em 450nm, utilizando ar como branco.

Cálculo do *cut off*: média dos controles negativos + 0,100

Interpretação do teste: uma amostra é considerada não reativa se sua DO é inferior ao valor do *cut off*, ao tempo que será considerada reativa se sua DO é igual ou superior ao valor do *cut off*.

3.2.3 ELISA 3 – EIAgen *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália)

O *kit* imunoenzimático EIAgen *Trypanosom cruzi* IgG + IgM (Adaltis, Bologna, Itália), comercializado com metodologia própria, como visto na sua identificação, é destinado para a determinação de anticorpos de classes IgG e IgM em soro ou plasma humanos. A análise das amostras por este *kit* foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia e Centro de Biotecnologia, na Universidade Federal de Pelotas.

Descrição da Técnica: Diluição da amostra na proporção de 1:101 (10µl de soro em 1mL de diluente – solução protéica contendo detergente, estabilizantes protéicos e preservativos). Adição de 100µl de soro diluído e controles positivo e negativo nas cavidades da microplaca, reservando a cavidade A1 para o branco de amostra. Incubação por 60 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera) com solução preparada a partir de tampão 25X concentrado, contendo imidazole, Tween 20 e preservativo. Adição de 100µl de conjugado, preparado na hora do uso pela diluição de 1:20 de anticorpo específico anti-IgG&M marcado com peroxidase estabilizado e concentrado em diluente próprio de solução protéica tamponada. Incubação por 30 minutos a 37°C. Lavagem (5X com 30 segundos de espera). Adição de 100µl da solução substrato, composta de mistura estabilizada de TMB e água oxigenada, pronta para uso. Incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Adição de solução de parada (ácido sulfúrico 0,3M), seguida de homogeneização. Leitura em comprimento de onda de 450nm em até 60 minutos, zerando com a cavidade A1.

Cálculo do *cut off*: média dos controles negativos + 0,200

Interpretação do teste: amostras com valor de densidade óptica menor que o *cut off* são classificadas como negativas, enquanto amostras com valor maior que o *cut off* são consideradas positivas para os anticorpos anti-*T.cruzi*.

3.2.4 HEMAGLUTINAÇÃO - CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina)

A técnica de hemaglutinação indireta foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas utilizando *kit* CHAGATEST HAI® – screening A-V (Wiener lab, Argentina), com metodologia própria, o qual utiliza-se de hemáceas de aves sensibilizadas com antígenos citoplasmáticos e de membrana de *T. cruzi* para produzir aglutinação em presença de anticorpos específicos.

Descrição da técnica: Diluição da amostras e controles 1/40 (10µL de amostra e controles em 400µL de diluente, composto de solução protéica em tampão). Adição de 50µL das diluições de amostras e controles em nas cavidades da microplaca de fundo em V. Adição de 25µL de antígeno nas cavidades. Mistura aplicando batidas suaves durante, no mínimo, 30 segundos. Repouso por 60 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de vibrações. Leitura visual: considerando-se não reativo quando há presença de um sedimento em forma de botão nítido e uniforme no fundo da cavidade; reativo fraco quando visto um manto pequeno no fundo da cavidade com botão definido no centro e fortemente reativo quando verificada formação de um filme ou manto de contornos irregulares no fundo da cavidade.

Em caso de amostras que apresentaram reatividade, mesmo que fraca, foi realizada a prova quantitativa, de mesma metodologia, porém realizando-se diluições seriadas do soro na placa. O título considerado corresponde à maior diluição de soro reativo.

Valor de referência indicado: com alerta de que este valor seja em termos de probabilidade, a indicação é de que consideram-se presumivelmente parasitados os indivíduos cujos soros são reativos com títulos maiores ou iguais a 1/40.

3.2.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - IMUNOCRUIZI® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Preparo das lâminas:

As lâminas foram preparadas com fixação de antígeno de *T. cruzi* obtido por cultivo em meio de LIT, sob a forma de epimastigota, comercializado pela biolab-

Mérieux (Imunocruzi®). A fixação do antígeno foi procedida conforme descrição do fabricante. As lâminas foram armazenadas em freezer -20°C para uso posterior.

Titulação do conjugado:

Sendo o título do conjugado variável para cada lote e devendo adequar-se em função dos reagentes e equipamentos usados, seguindo especificações do fabricante, foi estipulado o título a ser diluído o conjugado para análise das amostras. O conjugado utilizado foi antigamaglobulina de carneiro anti IgG humana marcada pelo isotiocianato de fluoresceína, FLUOLINE® (biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil).

Solução reveladora:

De acordo com especificação da técnica, usou-se azul de Evans em solução estoque de 10%, sendo esta diluída a 1% na hora de preparar o conjugado para uso.

A cada bateria de testes era retirada a quantidade de lâminas necessária do congelador, secadas a temperatura ambiente e identificadas para uso.

As amostras selecionadas para análise eram diluídas em PBS usando como base os resultados prévios do ELISA para o número de diluições a serem realizadas inicialmente para cada amostra. Caso não fosse suficiente, a amostra era submetida a análise novamente na próxima bateria de testes com um número maior de diluições.

Descrição da técnica: Adição de $20\mu\text{l}$ de cada diluição de soro por área. Incubação a $37^{\circ}\text{C}/30$ min em câmara úmida. Lavagem 2X /5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Adição de $20\mu\text{l}$ de conjugado em diluição pré-estabelecida preparado na hora do uso. Incubação a $37^{\circ}\text{C}/30$ min em câmara úmida. Lavagem 2X/5 min por imersão em tampão PBS com enxágüe em água destilada. Secagem delicada das lâminas com auxílio de papel filtro. Montagem para leitura com glicerina tamponada e lamínula. Observação em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40x.

Interpretação do teste: reação positiva era considerada quando observada fluorescência verde brilhante periférica ou por toda superfície dos protozoários e

reação negativa quando os parasitos apresentavam cor vermelha ou coloração verde fosca.

A cada bateria de testes a reação era controlada por dois controles positivos e dois controles negativos.

3.2.6 TESA – BLOT

O Immunoblot com antígeno TESA (antígeno de excreção e secreção de *T. cruzi*) foi aplicado em amostras que apresentavam resultados discordantes entre as técnicas, resultando em uma sorologia duvidosa. A escolha das amostras a serem analisadas pelo TESA-Blot foi realizada a partir dos grupos de resultados que serão apresentados na tab. 1, obtidos nas análises sorológicas.

As membranas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram gentilmente cedidas pela Dra. Eufrosina Umezawa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, acompanhadas de protocolo de realização da técnica e padrões positivos para análise dos resultados.

Conforme descrito por Umezawa et al. (1996), o TESA é obtido do sobrenadante da cultura de células LLC-MK₂ infectadas com cepa Y de *T. cruzi*.

As membranas contendo antígenos e bloqueadas com PBS pH 7,2 contendo leite em pó desnatado 5% foram cortadas em tiras de 0,4cm e incubadas com soro diluído 1:150 em PBS 7,2 com 1% leite por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, foram lavadas quatro vezes por cinco minutos em tampão PBS 7,2. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®), diluído 1:3000 em PBS 7,2 com leite 1% por 2 horas, sob agitação constante em temperatura ambiente. Novamente foram lavadas e cobertas por solução reveladora contendo 4-cloro-naphtol e água oxigenada em metanol e PBS 7,2 até que as bandas aparecessem. Para interrupção da reação, foram lavadas em água destilada e secas em papel filtro para posterior análise das bandas, comparando com tira positiva para soro padrão.

Segundo padrão de diagnóstico, amostras IgG positivas para *T. cruzi* reagem com banda de 150-160kDa. Vários pacientes de fase crônica também reagem com bandas SAPA (*shed acute-phase antigen*) de PM que varia de 120-210 kDa e uma banda de aproximadamente 95kDa.

Amostras com resultado duvidoso foram repetidas em concentração de 1:100.

A técnica de TESA-Blot foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados 161 soros que apresentaram reatividade em técnicas de diagnóstico para pesquisa de anti-*T. cruzi*. Na tab. 1 estão apresentados os resultados da análise destes soros nas seguintes técnicas: ELISA Chagatest, ELISA Chagatek, ELISA Adaltis, IFI e HAI.

Tabela 1 – Freqüência e porcentagem do padrão sorológico apresentado por 161 amostras de soros analisados por um painel de técnicas sorológicas.

Resultados dos testes					Freqüência	Porcentagem
1	1	1	1	1	106	65,84
1	1	1	1	0	10	6,21
1	1	1	0	0	6	3,73
1	0	1	0	1	2	1,24
1	1	1	0	1	1	0,62
1	0	1	0	0	9	5,59
1	1	0	0	0	1	0,62
0	1	1	0	0	4	2,48
0	0	1	0	0	1	0,62
1	0	0	0	0	19	11,8
0	1	1	1	1	1	0,62
0	1	0	0	0	1	0,62
					161	

Resultados não reagentes são representados por 0, enquanto resultados reagentes são representados por 1.

Ordem dos testes: ELISA Chagatest, ELISA Chagatek, ELISA Adaltis, HAI e IFI

De acordo com os dados da tab. 1, dos 161 soros analisados, 106 (65,84%) foram positivos em todos os testes utilizados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Pirard et al. (2005) ao estudarem IFI, duas HAIs e quatro ELISAs, já que das 207 amostras com reatividade em pelo menos uma das técnicas, 132 (63,77%) foram positivas em todos os testes. Gutierrez et al. (2004) selecionaram 94 amostras sororreagentes a partir de ELISA usando lisado de cepa local e observaram que 84% (79/94) foram reagentes em todos os testes aplicados (IFI, ELISA com lisado de cepa Y e ELISA com dois antígenos recombinantes).

Nas outras 55 amostras (34,16%) das 161 analisadas, houve discordância no resultado de pelo menos uma das técnicas, como verificado por Pirard et al. (2005), que obtiveram resultado similar de 36,23%. A diferença de resultados entre técnicas também foi descrita por Sánchez-Guillén et al. (2002), onde usando ELISA e HAI para triagem de doadores de sangue de Puebla, México, 210 amostras foram reativas em uma das técnicas, mas apenas em 166 amostras houve co-positividade entre elas. Novamente em amostras do México, de 996 positivas na HAI, apenas 647 (64%) confirmaram-se positivas na IFI (BRACHO et al., 1998).

À procura de fatores que possam ocasionar esta variabilidade de resultados entre diferentes técnicas na análise de uma mesma amostra, alguns elementos podem ser considerados. Há grande variabilidade quanto aos antígenos utilizados na preparação dos testes para detecção de anticorpos, seja na forma do parasito utilizada para produção, quantidade de antígenos e até na procedência da cepa.

Para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, um fator a ser considerado é a origem da cultura de *T. cruzi* utilizada para a produção do extrato antigênico, visto a grande variabilidade genética deste parasito. A heterogeneidade e variabilidade genética entre as cepas de *T. cruzi* são bastante conhecidas, com predominância de uma linhagem ou população em determinada localidade, identificadas como cepas regionais, o que modifica condições biológicas, de virulência, quadros clínicos dos hospedeiros e, conseqüentemente, a produção de anticorpos com comportamentos variáveis nos métodos diagnósticos (MOREL et al., 1980; CARNEIRO et al., 1991; SOUTO et al., 1996; FERNANDES et al., 1997; RUIZ-GARCIA et al., 2000; AÑEZ et al., 2004).

Na comparação de técnicas de imunodiagnóstico usando cepas de diferentes origens podem ser percebidas variações nos resultados das técnicas, aparecendo melhor desempenho quando utilizadas cepas regionais (SANCHÉZ et al., 2001; ENCISO et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2004). Da mesma maneira, a forma parasitária pode comprovadamente interferir no resultados de análises sorológicas, de modo que antígenos produzidos da forma tripomastigota, forma exclusiva de *Trypanosoma*, apresentam melhor especificidade e, em alguns casos, também sensibilidade (ALMEIDA et al., 1997; UMEZAWA et al., 2001; BERRIZBIETIA et al., 2004). Na rotina do sorodiagnóstico da Doença de Chagas, os *kits* são geralmente adquiridos a partir do material disponível no mercado, não havendo, na maioria das

vezes, como modificar estas variáveis. Neste estudo, por exemplo, dentre os *kits* utilizados, foi verificada esta variação.

Considerando apenas a técnica de ELISA, todas as amostras analisadas apresentaram reatividade para pelo menos uma das três marcas analisadas. Na fig. 1 são apresentadas as densidades ópticas das leituras dos três ELISAs utilizados na análise das 161 amostras deste estudo.

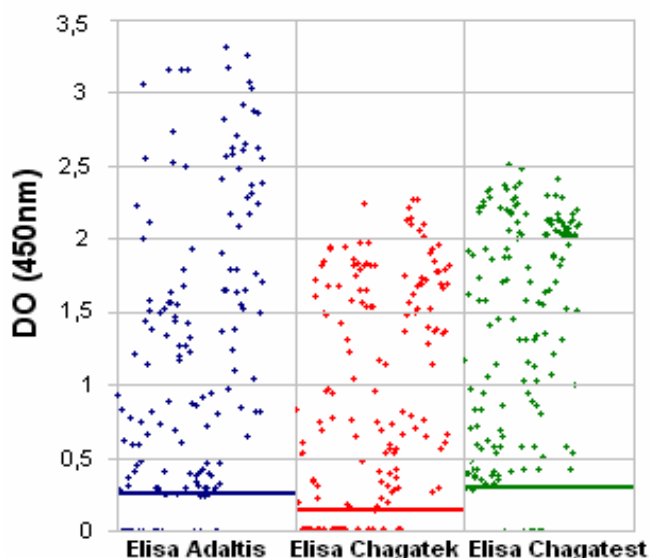


Fig 1- DO (450nm) obtida nas três técnicas de ELISA utilizadas na análise das 161 amostras selecionadas por apresentarem reatividade em alguma técnica de triagem para Doença de Chagas. A linha horizontal em destaque representa o *cut off* de cada técnica.

Na análise das 161 amostras, o ELISA Chagatest apresentou reatividade em 154 amostras (93,33%), com variação dos valores de absorvância de 0,274 a 2,500 (média=1,41), com um *cut off* de 0,303. Já o ELISA Chagatek reagiu em 129 amostras (78,2%), sendo a variação das absorvâncias de 0,131 a 2,279 (média=0,97), para um *cut off* de 0,138. O terceiro teste de ELISA (Adaltis) mostrou-se sensível a 140 amostras (84,8%), com absorvâncias variando de 0,252 a 3,312 (média=1,20) e um *cut off* de 0,243. Destaca-se que em amostras mais reativas a leitura de absorvância foi marcada por extrapolar a zona útil de leitura do aparelho. Considerando os valores de DO, Umezawa et al. (2003) distribuíram as amostras em grupos de baixa, média e alta DO, sendo a média de cada grupo, respectivamente, 0,69, 1,53 e 2,33 para o ELISA de extrato antigênico de epimastigotas e 1,04, 1,50 e 1,66 para o ELISA usando três antígenos recombinantes.

Como ELISA trata-se de um teste qualitativo, os valores de absorvância isoladamente não demonstram com clareza o nível de reatividade, sendo o resultado do teste definido pelo valor da absorvância em relação ao *cut off*. Desta forma, é possível calcular um índice de reatividade, dividindo o valor da DO pelo limiar de reatividade (*cut off*), o qual já apresenta o resultado considerando a absorvância em relação ao *cut off*. A partir deste valor é possível estimar a intensidade da reação. Referindo-se a este índice, os ELISA Chagatest, Chagatek e Adaltis apresentaram reatividades variando de 0,90 a 8,30, 0,96 a 16,28 e 1,02 a 13,35, respectivamente.

Conforme já comentado, delimitar o limiar de reatividade constitui-se talvez uma das variáveis interferentes no resultado. No caso das técnicas de ELISA disponibilizadas comercialmente, o cálculo deste valor é realizado a partir de uma curva produzida com os resultados de soros de indivíduos sabidamente infectados e não infectados com *T. cruzi*. Sabe-se, porém, que há soros de indivíduos que, embora apresentem DO acima do valor do *cut off*, não estão infectados (falso-positivos) e, por outro lado, existem aqueles com DO abaixo do valor de *cut off* e estão infectados (falso-negativos).

Na análise dos resultados das três técnicas de ELISA utilizadas neste estudo, pode-se verificar que estas foram concordantes em 123 amostras (76,4%). Já Malan et al. (2006) quando avaliaram três ELISAs para IgG, observaram concordância de 100% entre dois deles, enquanto o outro concordou com estes em 94,6% das amostras.

Na fig. 2 pode-se observar resultados reagente (fig. 2A) e não reagente (fig. 2B) para *T. cruzi* obtidos na avaliação dos 161 soros por imunofluorescência indireta. Destes 109 (67,7%) foram reagentes (R) e 52 (32,3%) foram não reagentes (NR). A IFI apareceu isoladamente discordando das outras técnicas em 10 amostras (6,21%), sendo que em todos estes casos apresentou resultado não reagente, enquanto nas demais técnicas o resultado foi R.

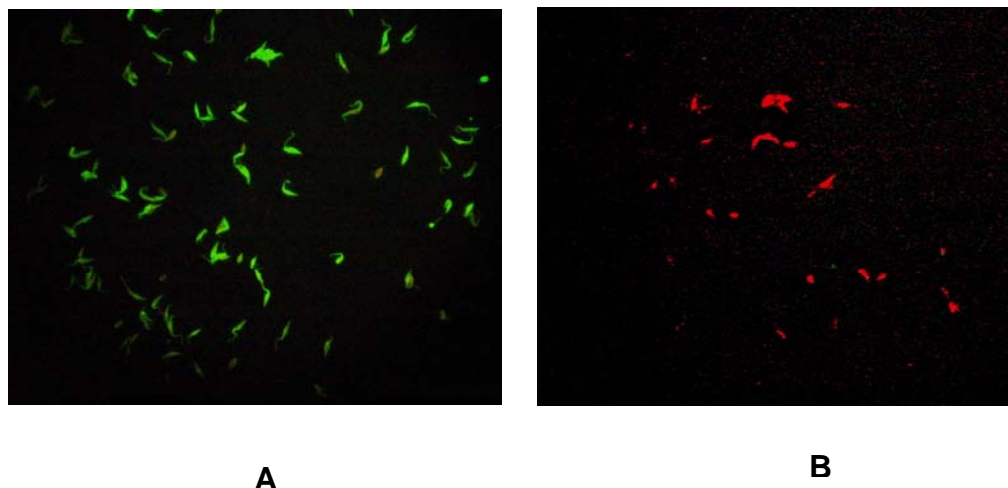


Fig. 2 – Padrão apresentado por soros R e NR para anti-*T. cruzi* na IFI: A - campo com antígenos fluorescentes, representando resultado R e B - campo com antígenos sem fluorescência, representando resultado NR.

O limite de reatividade para considerar uma amostra reagente ou não reagente é subjetivo na imunofluorescência, ficando a cargo do observador decidir o limite de reatividade da sua leitura, principalmente nos resultados em que aparecem campos com fraca fluorescência e em raras zonas. Neste estudo, títulos de 1:20 foram considerados como resultados positivos, assim como consideraram Umezawa et al. (1996) e Leiby et al. (2000). Para Silveira-Lacerda et al. (2004) esta diluição foi considerada como inconclusiva. Já para Oelemann et al. (1998), a menor reatividade considerada foi com título de 1:40, ao tempo que, Umezawa et al. (1996) utilizaram diluições a partir de 1:10 nas amostras de soro testadas e Pirard et al. (2005), títulos mínimos de 1:32. Em outro estudo, Umezawa et al. (2003) consideraram IFI inconclusiva com títulos de 1:20 - 1:40 e positiva com títulos a partir de 1:80.

Muitas vezes, a partir da análise dos resultados obtidos em outras técnicas, pode-se concluir como positiva ou negativa uma reatividade de 1:20 na IFI. Neste estudo essas situações foram observadas. Em alguns casos a reatividade 1:20 não representava uma amostra positiva, visto o resultado de outras técnicas e do TESA-Blot serem negativos, enquanto em outros casos, com amostras consideradas positivas na análise final, a reatividade da IFI era de 1:20. Amato Neto et al. (2002) defenderam a valorização de resultados positivos na IFI na diluição 1:20. O que parece é que amostras positivas apenas nesta diluição representam baixo nível de anticorpos ou devido a reações cruzadas ou a interferências, as quais podem ocorrer nas diferentes etapas da realização da técnica. Para triagem em bancos de sangue é fácil decidir pelo descarte do material. No entanto, para fins de diagnóstico, essas

baixas reatividades, mesmo em outras técnicas, constituem uma situação problemática. No caso da Imunofluorescência inclui-se, ainda, a preocupação com a subjetividade da leitura, o que poderá fazer com que uma amostra varie o resultado positivo/negativo dependendo de quem a processar.

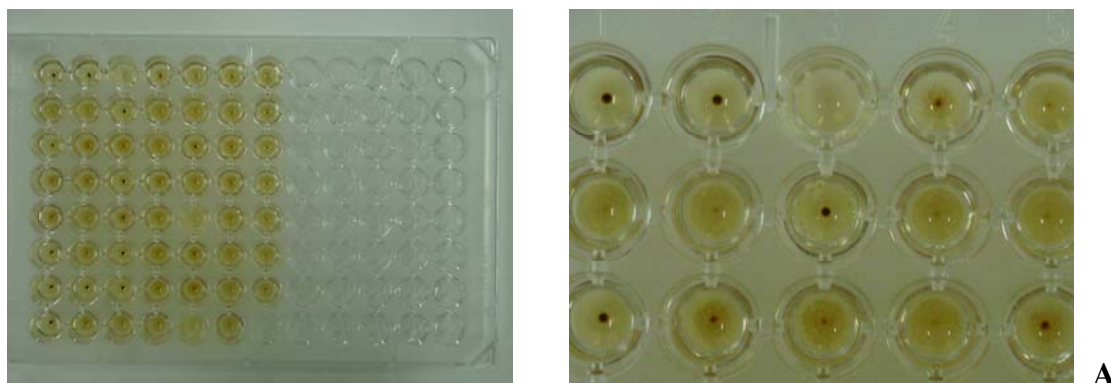


Fig. 3 – Reatividade para anti-*T. cruzi* de amostras de soro analisadas pela HAI. No detalhe (A) fica evidente amostras não reagentes com botão nítido ao fundo, amostras fracamente reagentes quando visto um manto com botão central e amostras fortemente reativas com um filme ou manto formado no fundo da cavidade.

A fig. 3 demonstra reações não reativas, fracamente reativas e fortemente reativas, obtidas na avaliação das 161 amostras de soro testadas através da reação de HAI. Foram verificadas 108 amostras R (67,1%) e 53 amostras NR (32,9%). A HAI discordou isoladamente do resultado das outras técnicas em apenas uma amostra (0,62%), sendo não reagente na HAI e reagente nos outros quatro testes.

De acordo com o que foi verificado, a técnica que mais apresentou resultados não reagentes isoladamente foi a imunofluorescência, visto que isso ocorreu em 10/161 amostras, ao tempo que ocorreu em apenas 1/161 com a HAI e 1/161 com o ELISA Chagatest. Discordando novamente do presente estudo, Pirard et al. (2005) não observaram a negatividade isolada na IFI em nenhuma das amostras e nem nas HAIs. Por outro lado, estes autores, observaram, assim como neste trabalho, uma amostra não reagente isoladamente no Chagatest. No caso das HAIs, verificaram, diferentemente, duas amostras as quais foram reagentes apenas nesta técnica.

Para a HAI a observação visual também é a forma utilizada para considerar os resultados, podendo haver variação de acordo com o responsável pela leitura da técnica, embora esteja bem estabelecido o que seja um resultado R, NR ou fracamente R.

Como não havia disponibilidade de material para todas amostras do estudo, o TESA-Blot foi aplicado em apenas algumas amostras selecionadas com diferentes padrões sorológicos, como método confirmatório para o diagnóstico convencional da Doença de Chagas (UMEZAWA et al., 1996), a fim de determinar o diagnóstico conclusivo dos soros que apresentaram discordância entre as diferentes técnicas utilizadas, conforme apresentado na tab.1. Também foram testadas amostras reativas em todos os testes, onde pode-se observar o perfil de bandas reconhecido pelos soros positivos para anti-*T.cruzi* (fig. 4). Todas as amostras em maior ou menor intensidade apresentam a banda de 150-160 kDa característica dos pacientes de fase crônica da Doença de chagas, além de uma banda de 95kDa. De acordo com Umezawa et al. (1996) considera-se o TESA-Blot como positivo quando os soros reagem com antígenos de 130-200kDa e/ou com antígenos de 150-160kDa, além de alguns soros também reagirem com bandas de 80-120kDa. Segundo Jazín et al. (1991) anticorpos contra antígenos de 160-170kDa aparecem na fase crônica da doença e Nakazawa et al. (2001) também consideraram bandas de 150-170kDa no TESA como relevantes no diagnóstico da Doença de Chagas.

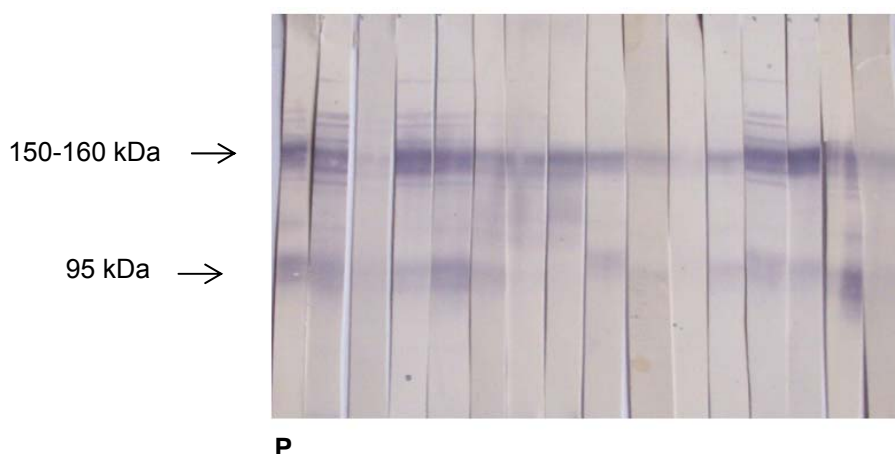


Figura 4 – Padrão de bandas do antígeno de excreção e secreção de tripomastigotas de *T. cruzi* reconhecidos no imunoblot de 15 das 106 amostras reagentes em todas as técnicas sorológicas realizadas. P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico.

Em algumas amostras ficou evidente o conjunto de bandas de 120-210kDa, referentes a bandas SAPA. Anticorpos anti-SAPA (*shed acute-phase antigen*) podem ser detectados 15 dias após manifestação de sintomas de fase aguda da Doença de

Chagas em humanos, podendo ser importante no diagnóstico de infecção recente desta doença (AFFRANCHINO et al., 1989). Entretanto, estes anticorpos podem permanecer também durante a fase crônica da doença (Umezawa et al., 1996).

A reatividade em apenas um dos ELISAs aconteceu em 21 amostras, sendo este fato mais comum com o Chagatest (19 amostras). Destas 21 amostras, oito foram analisadas pelo TESA-Blot, sendo seis das 19 do Chagatest, 1 do ELISA Chagatek e 1 do ELISA Adaltis. Das seis amostras reagentes apenas no Chagatest, somente uma foi positiva no TESA-Blot (fig. 5A), apresentando um perfil incomum, apenas com bandas SAPA. Portanto, neste caso, o ELISA Chagatest foi a única técnica com sensibilidade para esta amostra, sendo todas as outras, resultados falso-negativos. As amostras que foram reagentes apenas no ELISA Adaltis e ELISA Chagatek foram negativas no TESA-Blot (fig. 5B e 5C).

Em estudo de Pirard et al. (2005) comparando quatro ELISAs, duas HAIs e IFI, a positividade em apenas um ELISA ocorreu em 12 amostras (3%). No entanto, o Chagatest, um dos ELISAs em estudo, não apareceu reagente isoladamente em nenhuma das amostras, discordando do presente estudo, onde esta técnica foi a que apresentou maior número de resultados reagentes isolados, discordando, portanto, de todas as outras técnicas.

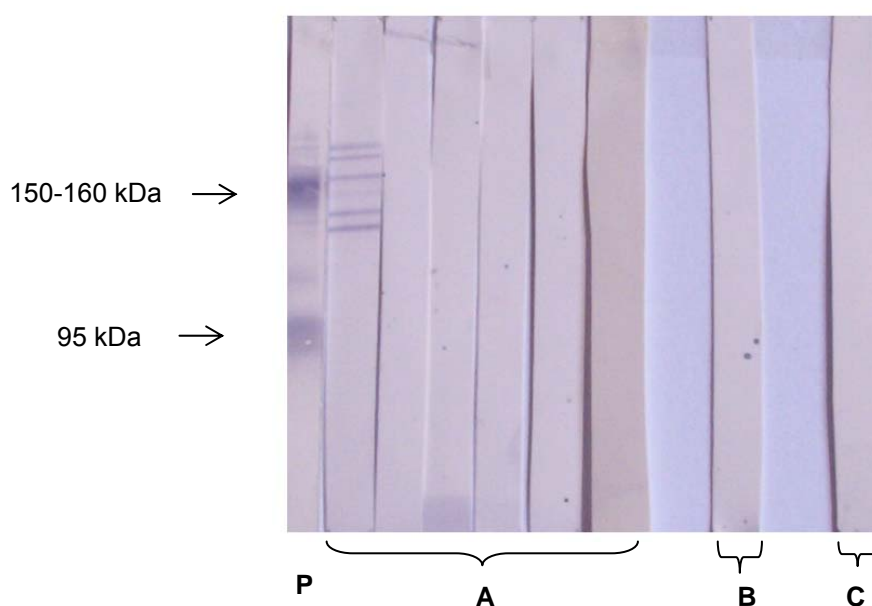


Figura 5 – TESA-Blot de oito das 21 amostras reagentes em apenas um dos ELISAs. P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico. O grupo de tiras A é composto por amostras do grupo 10000 da tab. 1; as tiras B e C referem-se às amostras 01000 e 00100, respectivamente, da tab.1.

Na fig. 6 pode-se observar que as dez amostras positivas somente em duas técnicas de ELISA, ao serem analisadas pelo TESA-Blot, mostraram-se negativas

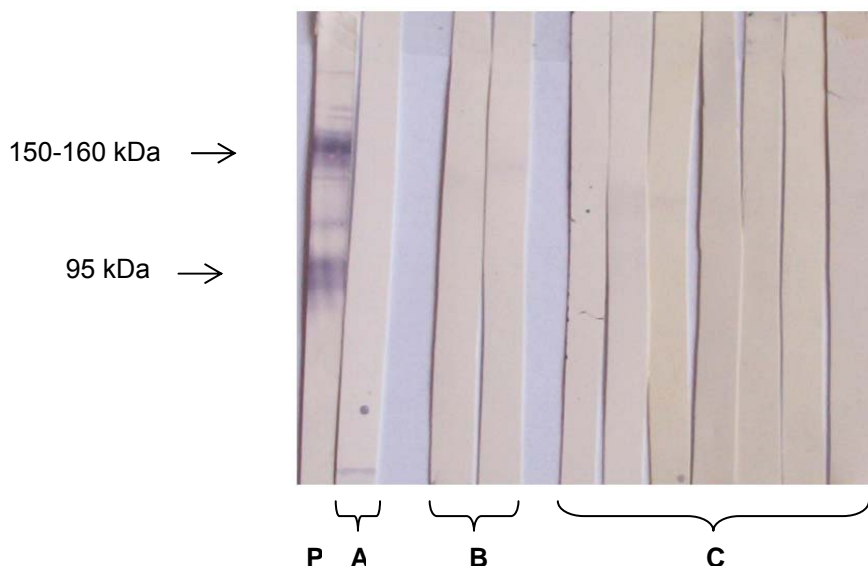


Figura 6 – TESA-Blot das dez amostras reagentes em apenas dois ELISAs. P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico. A tira A refere-se à amostra 11000; o grupo de tiras B e C é composto por amostras dos grupos 01100 e 10100 da tab. 1, respectivamente.

Conforme observado nas fig. 5 e 6, quando a amostra foi positiva em apenas uma ou duas técnicas, a tendência foi de um resultado falso-positivo, e os índices de reatividade apresentados no ELISA foram baixos, isto é, com valores de DO próximos ao *cut off*. O mesmo foi observado por Saez-Alquezar, em que a maioria de resultados negativos no teste confirmatório INNO-LIA foi detectada em soros que haviam reagido em apenas uma das técnicas de triagem, sugerindo que, nestes casos em que há reação em apenas uma das técnicas, trata-se de resultados falso-positivos.

Na análise das amostras com resultado reagente nos três ELISAs e não reagentes na HAI e IFI (6/161) pelo TESA-Blot, 50% foram negativas e 50% fracamente positivas (fig. 7).

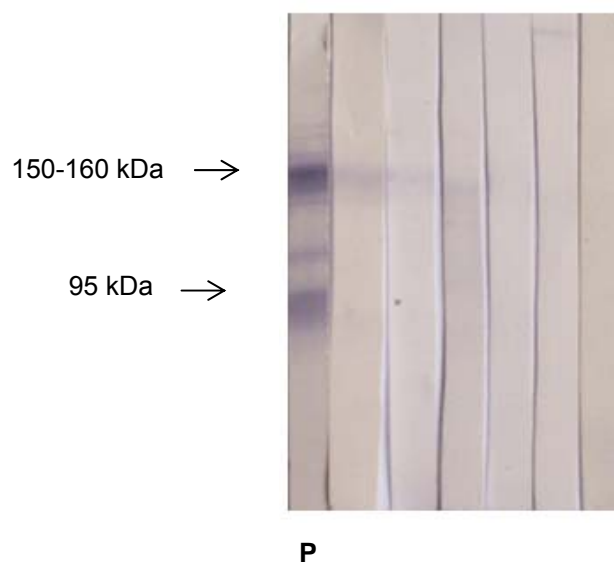


Fig. 7 - TESA-Blot das seis amostras reagentes nos ELISAs e não reagentes na HAI e IFI (grupo 11100). P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico.

Analisando as amostras reagentes em quatro técnicas e não reagentes para IFI e ELISA Chagatest, estas foram todas positivas no TESA-Blot, demonstrando que estas técnicas apresentaram resultados falso-negativos, logo, com *déficit* na sensibilidade (fig. 8 e 9A). Na fig. 8 é visível em todas as tiras a banda característica de 150-160kDa, enquanto na fig. 9A, podem ser visualizadas as bandas de 150-160kDa, além da banda de 95Kda. Já no caso em que isto aconteceu com a HAI, ou seja, quando apenas esta técnica foi não reagente, a amostra apresentou-se negativa no TESA-Blot (fig. 9B). A banda observada na fig. 9B não representa positividade por não corresponder à nenhuma das bandas identificadas como características de soro padrão chagásico positivo.

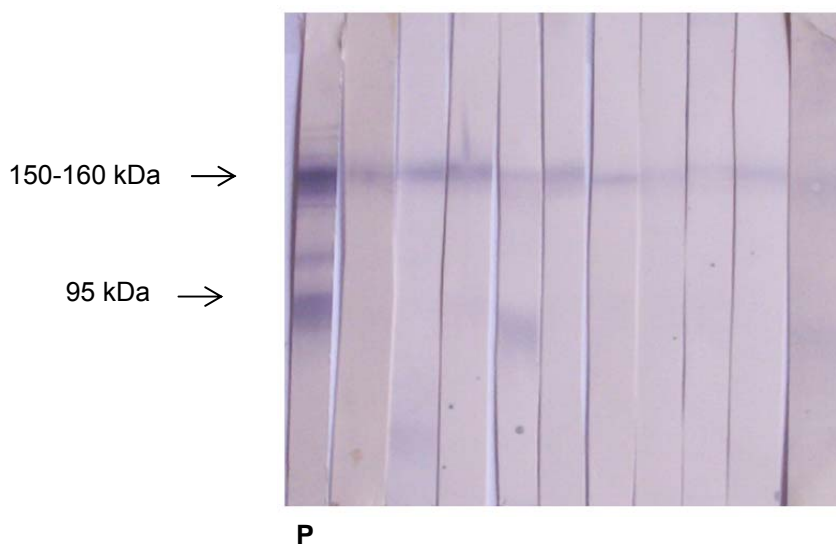


Figura 8 – Padrão de bandas do antígeno de excreção e secreção de tripomastigotas de *T. cruzi* reconhecidos no *imunoblot* das dez amostras não reagentes apenas na IFI (grupo 11110). P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico.

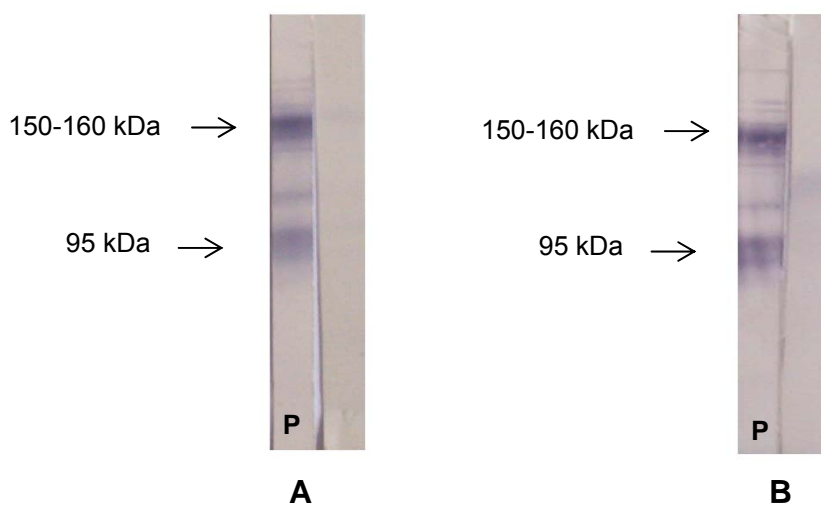


Fig 9 – TESA-Blot de amostras não reagentes em apenas uma técnica. A refere-se à amostra não reagente no ELISA Chagatek (01111); B refere-se à amostra não reagente na HAI (11101). P representa o padrão de soro positivo de chagásico crônico.

Mesmo não tendo sido realizada uma metodologia com escolha de grupos de soros para testes de especificidade e sensibilidade, estes parâmetros puderam ser observados a partir de alguns resultados obtidos. O ELISA Chagatest, por exemplo, apresentou-se NR em determinada amostra que foi reagente em todas as outras técnicas e no TESA-Blot, mostrando não ser totalmente sensível. Por outro lado, apresentou grande número de resultados falso-positivos, o que acarreta em grande

perda na especificidade desta técnica. Quando aplicado o TESA-Blot nas 10 amostras reagentes em dois ELISAS, o resultados destes foi negativo, mostrando resultados falso-positivos pelos ELISAs. No caso de reatividade nos três ELISAs e não na IFI e HAI, a positividade no TESA-Blot foi 50%, mostrando falhas de especificidade e sensibilidade em todas as técnicas.

A IFI foi a técnica com mais resultados falso-negativos detectados neste estudo, pois em 10 amostras em que mostrou-se não reagente, o TESA-Blot mostrou-se positivo. Por último, o caso da amostra 11101, o resultado diferente apenas na HAI concordou com o resultado do TESA-Blot negativo.

A partir dos resultados observados entre diferentes técnicas para uma mesma amostra, fica evidente a variação que pode ocorrer, sendo esta uma grande preocupação no sorodiagnóstico da Doença de Chagas. Parece importante reiterar que os *kits* disponibilizados comercialmente são produzidos a partir de determinadas cepas de *T. cruzi* e comercializados para diversas regiões, provavelmente desconsiderando a variabilidade genética deste parasito. Na impossibilidade de considerar esta hipótese, pela dificuldade de produção de *kits* com cepas regionais, seria interessante que, pelo menos o extrato antigênico utilizado, fosse composto de cepas de diferentes regiões. Além disso, permanece a preocupação com a forma parasitária a ser utilizada na produção do antígeno.

Complementando, cabe comentar que, além dos fatores relativos aos *kits*, já considerados, ainda outras interferências podem ser responsáveis por reações inespecíficas. Os resultados duvidosos ou falsamente positivos podem ser ocasionados por amostras inadequadas, como lipêmicas, ictéricas, hemolisadas ou por questões biológicas, como reações cruzadas ou indivíduos em tratamento. As reações cruzadas mais comuns para a Doença de Chagas acontecem com soro de pacientes com leishmaniose, o que, a princípio, não representou um problema nas amostras deste estudo, já que esta doença não tem importância epidemiológica em nossa região.

A intenção de qualquer pesquisa sorológica é adotar testes com o máximo de sensibilidade e especificidade. Porém, sabe-se que, muitas vezes, ao aumentar-se sensibilidade de uma técnica pode perder-se em especificidade e vice-versa, devendo-se associar duas técnicas ou optar pelo teste de acordo com a situação em que será aplicado. No caso da Doença de Chagas, por exemplo, sensibilidade é essencial nos bancos de sangue e especificidade em diagnóstico. Segundo Manual

Técnico da ANVISA/MS (2005) para a triagem sorológica em bancos de sangue, ELISA é o método de escolha, enquanto para o diagnóstico de casos individuais, é indicada a IFI, associada à história epidemiológica. Entretanto, mesmo considerando apenas a técnica de ELISA observou-se muita variação entre as diversas marcas de kits. Assim, fica a necessidade de conhecer as características das diferentes técnicas, de modo a associá-las para obtenção de maiores níveis de sensibilidade e especificidade, adequando sempre à situação da doença e do paciente.

CONCLUSÕES

- Ocorre discordância entre o resultado dos diversos métodos, e até entre as mesmas técnicas de diferentes marcas disponibilizadas para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas.

- É necessário aliar o uso de mais de uma técnica para definir resultado no sorodiagnóstico da Doença de Chagas, visto a variabilidade de resultados observada nas técnicas disponíveis para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas.

- A imunofluorescência indireta foi a técnica que mais apresentou resultados falso-negativos, enquanto o maior número de falso-positivos ocorreu no ELISA Chagatest.

- As amostras regionais positivas analisadas no TESA-Blot concordam com o padrão de bandas de 150-160kDa, 95kDa e conjunto de bandas 120-210kDa (SAPA), confirmando o perfil já estabelecido para a Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- AFFRANCHINO, J.L.; IBANEZ, C.F.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; REYES, M.B.; MACINA, R.A.; ASLUND, L.; PETERSON, U.; FRASCH, A.C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' Disease. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.34, n.3, p.221-228, 1989.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças no Sangue.** 1 ed. 2 reimp. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- ALMEIDA, I.C.; COVAS, D.T.; SOUSSUMI, L.M.; TRAVASSOS, L.R. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion.** v.37, n.8, p.850-PAG, 1997.
- AMATO NETO, V.; MARCHI, C.R. DE; ROSSITO, S.T.; NASCIMENTO, M.S. Avaliação da sensibilidade da diluição 1/20 pela reação de imunofluorescência indireta, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.35, n.2, p.195-196, 2002.
- AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F.M. da; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.SD.; RAMÍREZ, J.L.; TEIXEIRA, M.M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Trop. Med. Int. Health.** v.9, n.12, p.1319- 1326, 2004.
- BERRIZBIETIA, M.; NDAO, M.; GOTTSCHALK, M.; ACHE, A.; VASQUEZ, F.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B.J. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the Three assays. **J. Clin. Microbiol.** v.42, n.4, p.1766-1769, 2004.

BERRIZBIETIA, M.; NDAO, M.; BUBIS, J.; GOTTSCHALK, M.; ACHE, A.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B.J. Purified Excreted-Secreted Antigens from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes as Tools for Diagnosis of Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v.44, n.2, p.291-296, 2006.

BLEJER, J.L.; SAGUIER, M.C.; DINAPOLI, R.A.; SALAMONE, H.J. Prevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors. **Medicina (B. Aires).** v.59, n.2, p.129-132, 1999.

BRACHO, C.G.; GARCÍA, L.G.; VERDUGO, J.F.; MARTÍNEZ, S.G.; COSME, M.T.; MELGAR, C.R.; CASTREJÓN, O.V. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. **Rev. Panam. Salud. Publica.** v.4, n.2, p.94-99, 1998.

BRENER, Z. e ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 463 p.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.86, n.4, p.387-393, 1991.

CARVALHO, M.R.; KRIEGER, M.A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; SHIKANAI-YASSUDA, M.A.; FERREIRA, A.W.; PEREIRA, J.B.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.F.. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. **Transfusion.** v.33, n.10, p.830- 834, 1993.

ENCISO, C.; MONTILLA, M.; SANTACRUZ, M.M.; NICHOLLS, R.S.; RODRÍGUEZ, A.; MERCADO, M.; PUERTA, C. Comparison of the indirect immunofluorescent (IFAT), ELISA test and the comercial Chagatek test for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies detection. **Biomedica.** v.24, n. 1, p.104-108, 2004.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL, P.G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from Chronic Chagasic Patients, Triatomines and Opossums Naturally Infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.92, n.3, p.343-351, 1997.

GUALBERTO, R.C.R.; BENTES, I.R.G.; VALENTE, C.I.D.; FRANCÊS, L.T.V.M.; LEMOS, J.A.R.; BRITO JR., L.C. Reação sorológica cruzada para Doença de Chagas e anti-HCV em pacientes com Leishmaniose (sic). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** n.27, supl.2, p.335, 2005.

GUTIERREZ, R.; ANGULO, V.M.; TARAZONA, Z.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. **Parasitology**. v.129, n.4, p.439-444, 2004.

JAZÍN, E.E.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; FRASCH, A.C. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. **Infect. Immun.** v.59, n.6, p.2189-2191, 1991.

LANA, M. de e TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.73-96.

LEIBY, D.A.; WENDEL, S.; TAKAOKA, D.T.; FACHINI, R.M.; OLIVEIRA, L.C.; TIBBALS, M.A. Serologic Testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of Radioimmuno-precipitation Assay with Commercially Available Indirect Immunofluorescence Assay, Indirect Hemmagglutination Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kits. **J. Clin. Microbiol.** v.38, n.2, p.639-642, 2000.

MALAN, A.K.; AVELAR, E.; LITWIN, S.E.; HILL, H.R.; LITWIN, C.M. Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* evaluation of three enzyme immunoassay and an indirect immunofluorescent assay. **J. Med. Microbiol.** v.55, pt.2, p. 171-178, 2006.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.77, n.11, p.6810-6814, 1980.

NAKAZAWA, M.; ROSA, D.S.; PEREIRA, V.R.A.; MOURA, M.O.; FURTADO, V.C.; SOUZA, W.V.; BARROS, M.N.D.S.; ABATH, F.G.C.; GOMES, Y.M. Excretory-Secretory Antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of Chronic Chagas Disease. **Clin. Diagn. Lab. Immun.** v.8, n.5, p.1024-1027, 2001.

OELEMANN, W.M.R.; TEIXEIRA, M.G.M.; COSTA, G.C.V. DA; BORGES-PEREIRA, J.; CASTRO, J.A.F. DE; COURA, J.R.; PERALTA, J.M. Evaluation of Three Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n.9, p.2423-2427, 1998.

PALACIOS, X.; BELLI, A.; ESPINO, A.M. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica**. v. 8, n.6, p.411-417, 2000.

PIRARD, M.; IHHOSHI, N.; BOELAERT, M.; BASANTA, P.; LÓPEZ, F.; STUYFT, P.V. The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. **Transfusion**. v.45, n.4, p.554-561, 2005.

RUIZ-GARCIA, M.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.O.; ANGARITA, L.; ALVAREZ, D. Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. **Heredity**. v.85, n.4, p.318-327, 2000.

SAEZ-ALQUÉZAR, A.; SABINO, E.C.; SALLES, N.; CHAMONE, D.F.; HULSTAERT, F.; POTTEL, H.; STOOPS, E.; SERRÍN, M. Serological Confirmation of Chagas' Disease by a Recombinant and Peptide Antigen Line Immunoassay: INNO-LIA Chagas. **J. Clinical Microbiol.** v. 38, n.2, p.851-854, 2000.

SAÉZ-ALQUÉZAR, A.; MARQUES, W.; BOTINI, M.B.; ALVES, A. Avaliação de um kit Elisa recombinante para a determinação de anticorpos anti-T.cruzi. **Rev.Bras. Hematol. Hemoter.** v. 26, supl. 2, p.284, 2004.

SANCHÉZ-GUILLÉN, M.C.; BARNABÉ, C.; JUEGAN, J.F.; TIBAYRENC, M.; VELÁSQUEZ-ROJAS, M.; MARTÍNEZ-MUNGUÍA, J.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; ROSAS-RAMÍREZ, M.; PÉREZ-FUENTES, R. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non endemic area of Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.97, n.7, p. 947-952, 2002.

SCHATTSCHEIDER, W.; LOPES, E.R.; ALENCAR, J.E. DE; BIENZLE, U.; FELDMIEIER, H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian Patients. **Trop. Geogr. Med.** v.44, n.3, p.210-218, 1992.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; SILVA, A.G.; JUNIOR, S.F.; SOUZA, M.A.; KESPER, N.; BOTELHO-FILHO, A.; UMEZAWA, E.S. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox. Sang.** v.87, n.3, p.204-207, 2004.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.83, n.2, p.141-152, 1996.

TELLES, S.; ABATE, T.; SLEZYNGER, T.; HENRIQUEZ, D.A. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. **FEMS Immunol. Med. Mic.** v.37, n.1, p.23-28, 2003.

UMEZAWA, E.S. NASCIMENTO, M.S.; KESPER JR., N.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas' Disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, n.9, p.2143-2147, 1996.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; STOLF, A.M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas'disease. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v.39, n.1, p.169-176, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

- Ocorre a sororreatividade para *T. cruzi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Pelotas, sendo estes portadores desinformados da doença.

- O encontro de soropositividade para *T. cruzi* entre as gestantes da região de Pelotas, RS, indica possibilidade de transmissão de Doença de Chagas por via congênita nesta região.

- Ocorre discordância entre o resultado dos diversos métodos, e até entre as mesmas técnicas de diferentes marcas disponíveis para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, sendo necessário aliar o uso de mais de uma técnica para definir o diagnóstico definitivo.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABAD-FRANCH, F.; AGUILAR v, H.M.; PAUCAR C, A.; LOROSA, E.S.; NOIREAU, F. Observations on the Domestic Ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, n.2, p.199-202, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n 153. Brasília, 14 jun. 2004.

ALMEIDA, C.E.; VINHAES, M.C.; ALMEIDA, J.R. de; SILVEIRA, A.C.; COSTA, J. Monitoring the Domiciliary and Peridomiciliary Invasion Process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.95, n.6, p.761-768, 2000.

ALMEIDA, C.E.; DUARTE, R.; NASCIMENTO, R.G. do; PACHECO, R.S.; COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic Resources and Ecological Observations of Five Populations Collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.97, n.8, p.1127-1131, 2002.

ANDERSON, J. Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. **Trends in Parasitology.** v.20, n.2, p.52-53, 2004.

ANDRADE, S.G.; CARNEIRO FILHO, A.; SOUZA, A.J.M. de; LIMA, E.S. de; ANDRADE, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol.** v.78, n.6, p.391-399, 1997.

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.71-80, 1999.

AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F.M. da; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.SD.; RAMÍREZ, J.L.; TEIXEIRA, M.M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Trop. Med. Int. Health.** v.9, n.12, p.1319- 1326, 2004.

ARAÚJO-JORGE, T.C. de. Biology and Ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-years Old Challenge for Scientists. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.131-134, 1999.

ARRIETA, R. DAQUINO, B.; ROSSO, N.; FERRERAS, M.G.; JUAREZ, N. Evaluation of a screening method for Chagas disease in São Luis, Argentina. **Salud Publica México.** v.46, n.5, p.430-437, 2004.

d'ÁVILA S.C.G.P.; d'ÁVILA, A.M.M.P.; PAGLIARI, C.; GONÇALVES, V.M.; DUARTE, M.I.S. Eritema nodoso como forma de reativação da doença de Chagas em transplantado cardíaco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.1, p.61-63, 2005.

BAR, M.E.; DAMBORSKY, M.P.; OSCHEROV, E.B.; MILANO, A.M.F.; AVALOS, G.; WISNIVESKY-COLLI, C. Triatomines Involved in Domestic and Wild *Trypanosoma cruzi* Transmission in Concepción, Corrientes, Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, n.1, p.43-46, 2002.

BARCAN, L.; LUNAO, C.; Clara, L.; CÍNGARA, A.; VALLEDOR, A.; RISSIOI, A.M.de; GADANOVA, A.; GARCIA, M.M.; SANTIBANES, E. de; RIARTE, A. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. **Liver Transplant.** v.11, n.9, p.1112-1116, 2005.

BARROS, M.N.D.S.; DUARTE NETO, A.N.; PEREIRA, V.R.A.; NAKASAWA, M.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; MARTINEZ, R. Avaliação do transudato da mucosa oral no imunodiagnóstico da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.41, n.4, p.265-266, 1999.

BARUFFA, G. Infecção Chagásica entre os doadores do Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.**v.65, n.1, p.115-118, 1985.

BARUFFA, G. e ALCÂNTARA FILHO, A. Inquérito sorológico e entomológico da infecção pelo *T.cruzi* na região sul do Rio Grande do Sul. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** v.65, n.1, p.171-179, 1985.

BASSO, B. Y MORETTI, E.R. Deteccion del *Trypanosoma cruzi* por hemocultivo em pacientes com enfermidad de Chagas crônica. **Medicina (B. Aires).** v.44, n.1, p.41-47, 1984.

BITTENCOURT, A.L.; VIEIRA, G.O.; TAVARES, H.C.; MOTA, E.; MAGUIRE, J. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. Report of case with Megaesophagus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.33, n.1, p.30-33, 1984.

BLANCO, S.B.; SEGURA, E.L.; CURA, E.N.; CHUIT, R.; TULIÁN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GÜRTLER, R.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. **Trop. Med. Int. Health.** v.5, n.4, p.293-301, 2000.

BONAMETTI, A.M.; CASTELO FILHO, A.; RAMOS, L.R.; CAMARGO, E.D.; NAKAMURA, P.M.; BALDY, J.L. da S.; MATSUO, T. Soroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in students at the seven-fourteen age range, Londrina, PR, Brazil, in 1995. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.93, n.6, p.727-732, 1998.

BORGES, J. Frequência de sorologia reagente para a Doença de Chagas em doadores de sangue da HEMOCLIN, Pelotas, RS. UFPel – Curso de Ciências Biológicas (**Monografia** de Conclusão de Curso), Pelotas, 2004.

BRASHEAR, R.J. ET AL. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. I. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. **Transfusion.** v.35, n.3, p.213-218, 1995.

BRENER, Z. e ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 463 p.

BRITO, C.M.M. de; RIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastid Biol. Dis.** v.2, p. 17-24, 2003.

CABRINE-SANTOS, M.; SANTOS, V.M. dos; LIMA, M.A. de; ABREU, M.E.A. de; LAGES-SILVA, E.; RAMPIREZ, L.E. Genitourinary Changes in Hamsters Infected and Reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, n.4, p.523-528, 2003.

CAMANDAROBA, E.L.; PINHEIRO LIMA, C.M.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.44, n.2, p.97-103, 2002.

CAMPOS, R.F.; GONÇALVES, M.S.; REIS, E.A.G. dos; REIS, M.G. dos; ANDRADE, S.G. Comparative Analysis by Polymerase Chain Reaction Amplified Minicircles of Kinetoplast DNA of a Stable Strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its Clones and Subclones: Possibility of Predominance of a Principal Clone in this Area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, n.1, p.23-29, 1999.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.86, n.4, p.387-393, 1991.

CARVALHO, M.F.C.; FRANCO, M.F. de; SOARES, V.A. Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.39, n.4, p.223-226, 1997.

CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. de; COIMBRA, E.S. Internalization of Components of the Host Cell Plasma Membrane During Infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.143-147, 1999.

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. Res.** v.88, n.10, p.894-900, 2002.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACEDO, V. Influência da parasitemia na evolução da doença de chagas crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.1, p.1-6, 2005.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DOTSON, E.M.; LINS, A.; VINHAES, M.; SILVEIRA, A.C.; BERAD, C.B. The Epidemiologic Importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas Disease Vector in Brazil: a Revision of Domiciliary Captures during 1993-1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, n.4, p.443-449, 2003.

COUTINHO, M.; FREIRE Jr, O.; DIAS, J.C.P. The Noble Enigma: Chagas' Nominations for the Nobel Prize. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.123-129, 1999.

CUBA, C.A.; ABAD-FRANCH, F.; ROLDÁN RODRÍGUEZ, J.; VARGAS VÁSQUEZ, F.; POLLACK VELÁSQUEZ, C.; MILES, M.A. The Triatomines of Northern Peru, with Emphasis on the Ecology and Infection by Trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, n.2, p.175-183, 2002.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais.** São Paulo: Atheneu, 1999. p.81-111.

DIAS, J.C.P. e SCHOFIELD, C.J. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.103- 121, 1999.

DINIZ, F.B.; UETA, R.R.; PEDROSA, A.M. da C.; AREIAS, M. da C.; PEREIRA, V.R.A.; SILVA, E.D.; SILVA JR, J.G. da; FERREIRA, A.G.P.; GOMES, Y.M. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic electrodes. **Biosens. Bioelectron.** v.19, n.2, p.79-84, 2003.

DUMONTEIL, E.; RUIZ-PIÑA, H.; RODRIGUEZ-FÉLIX, E.; BARRERA-PÉREZ, M.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; RABINOVICH, J.E.; MENU, F. Re-infestation of Houses by *Triatoma dimidiata* after Intra-domicile Insecticide Application in the Yucatán Peninsula, Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.99, n.3, p.253-256, 2004.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C. et al. The Genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science.** v.309, n.5733, p.409-415, 2005.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL, P.G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from Chronic Chagasic Patients, Triatomines and Opossums Naturally Infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.92, n.3, p.343-351, 1997.

FERREIRA, A.A.; COLLIW, C.P.I., YAMANAKA, H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosens. Bioelectron.** v.21, n.1, p.175-181, 2005.

FERREIRA, A.W. e ÁVILA S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 16: Doença de Chagas. p. 144-149.

FREIJI, H. e ALTCHER, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin. Infect. Dis.** v.21, n.3, p.551-555, 1995.

FREITAS, H.; CHIZZOLA, P.R.; PAES, A.T.; LIMA, A.C.P. DE; MANSUR, A.J. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas heart disease. **Int. J. Cardiol.** v.102, n.2, p.239-247, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – FUNASA. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 4 ed, cap. 5.7, 1996.

GARCIA, E.S.; GONZALES, M.S.; AZAMBUJA, P. Biological Factors Involving *Trypanosoma cruzi* Life Cycle in the Invertebrate Vector, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p. 213-216, 1999.

GARZONI, L.R.; MASUDA, M.O.; CAPELLA, M.M.; LOPES, A.G.; MEIRELLES, M.N.S.L. de. Characterization of $[Ca^{2+}]$; Responses in Primary Cultures of Mouse cardiomyocytes Induced by *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, n.4, p.487-493, 2003.

JUARÉZ, M.P.; CARLSON, D.A.; SALAZAR SCHETTINO, P.M.; MIJAILOVSKY, S.; ROJAS, G. Cuticular Hydrocarbons of Chagas Disease Vectors in Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, n.6, p.819-827, 2002.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E.; WHICKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. **T. Roy. Soc. Trop. Med. H.** v.90, n.2, p.129-132, 1996.

KATZIN, A.M.; MARCIPAR, A.; FREILIJ, H.; CORRAL, R.; MARCIPAR, A.; FREILIJ, H.; CORRAL, YANOVSKY, J.F. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic chagas disease by agglutination test. **Exp. Parasitol.** v.68, n.2, p.208-215, 1989.

KERNDT, P.R.; WASKIN, H.A.; KIRCHHOFF, L.V.; STEURER, F.; WATERMAN, S.H.; NELSON, J.M.; GELLERT, G.A.; SHULMAN I.A. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, Califórnia, Brazil. **Transfusion.** v.31, n.9, p.814-818, 1991.

LANA, M. de e TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana.** 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.73-96.

LEIBY, D.A.; WENDEL, S.; TAKAOKA, D.T.; FACHINI, R.M.; OLIVEIRA, L.C.; TIBBALS, M.A. Serologic Testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of Radioimmunoprecipitation Assay with Commercially Available Indirect Immunofluorescence Assay, Indirect Hemmagglutination Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kits. **J. Clin. Microbiol.** v.38, n.2, p.639-642, 2000.

LENT, H. Evolução dos Conhecimentos sobre Vetores da Doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl.I, p.89-92, 1999.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. BATISTA, S.M.; CUNHA JR., J.G.; ROCHA, A.; MIZIARA, L.; RIBEIRO, J.U., PATTO, R.J. Post-mortem diagnosis of Chronic Chagas' disease: comparative evaluation of three serological tests on pericardial fluid. **T. Roy. Soc. Trop. Med. H.** v.72, n.3, p.244-246, 1978.

LUQUETTI, A.O. Evolution of knowledge on the Etiological Diagnosis of Chagasic Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.283-284, 1999.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Rev. Mol. Med.** v.4, n.1, p.1-16, 2002.

MACHADO, E.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; GOMES, S.B.P. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in the inhabitants of urban and rural areas of Abadia dos Dourados, state of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.40, n.5, 1998.

MADALOSSO, G.; PELLINI, A.C.G.; VASCONCELOS, M.J.; RIBEIRO, A.F.; WEISSMAN, L.; OLIVEIRA FILHO, G.S.; OLIVEIRA, A.C.P. DE; VIDAL, J.E. Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS- defining illness in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.46, n.4, p.199-202, 2004.

MAGALLÓN-GASTÉLUM, E.; MAGDALENO-PEÑALOZA, N.C.; KATTHAIN-DUCHATEAU, G.; TRUJILLO-CONTRERAS, F.; LOZANO-KASTEN, F.J.; HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, R. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Traitominae), en el estado de Jalisco, México. **Rev. Biomed.** v.9, n.3, p.151-157, 1998.

MARTINS-FILHO, O.A.; ELOI-SANTOS, S.M.; CARVALHO, A.T.; OLIVEIRA, R.C.; RASSI, A.; LUQUETTI, A.O., RASSI, G.G.; BRENER, Z. Doublé-Blind Study to Evaluate Flow Cytometry Analysis of Anti-Live Trypomastigote Antibodies for Monitoring Treatment Efficacy in Cases of Human Chagas' Disease. **Clin. Diagn. Lab. Immun.** v.9, n.5, p.1107-1113, 2002.

MONROY, C.; RODAS, A.; MEJÍA, M.; ROSALES, R.; TABARU, Y. Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infections Rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, n.3, p.305-310, 2003.

MONTOYA, R.; DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Doença de Chagas em uma comunidade do Sudeste do Brasil: I. Seguimento sorológico em uma área com controle vetorial. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.45, n.5, p.269-274, 2003.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.77, n.11, p.6810-6814, 1980.

MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; PAEZ, M.C.; CHAUL, M.; BARBIERI, G.; FEIJOO, D.C.; SARTORI, M.J.; PAEZ, R.C. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.1, p.53-55, 2005.

MORTARA, R.A.; PROCÓPIO, D.O.; BARROS, H.C.; VERBISCK, N.V.; ANDREOLI, W.K., SILVA, R.B.S.; SILVA, S. da. Feature of Host Cell Invasion by Different Infective Forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.135-137, 1999.

NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica.** São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 19: Doença de Chagas. p. 113-133.

NISIDA, I.V.V.; AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; DUARTE, M.I.S.; UMEZAWA, E.S. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three Health Institutions in São Paulo City, Brazil. **Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo.** v.41, n.5, p.305-311, 1999.

PACHECO, R.S.; FERREIRA, M.S.; MACHADO, M.I.; BRITO, C.M.; PIRES, M.Q.; DA-CRUZ, A.M.; COUTINHO, S.G. Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.93, n.2, p.165-169, 1998.

PALACIOS, X.; BELLI, A.; ESPINO, A.M. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indireto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica.** v. 8, n.6, p.411-417, 2000.

PRATA, A. Evolution of the Clinical and Epidemiological Knowledge about Chagas Disease 90 Years After its Discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.81-88, 1999.

PINHO, R.T.; PEDROSA, R.C.; COSTA-MARTINS, P.; CASTELLO-BRANCO, L.R.R. Saliva ELISA: a method for the diagnosis os chronic Chagas disease in endemic areas. **Acta Tropica.** v.72, n.1, p.31-38, 1999.

PONCE, C.; PONCE, E.; VINELLI, E.; MONTOYA, A.; AGUILAR, V. de; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; RANGEL-ALDÃO, R.; LEVIN, M.J.; ESFANDIARI, J.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O.; SILVEIRA, J.F. da. Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi* – Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. **J. Clin. Microbiol.** v.43, n.10, p.5065-6058, 2005.

PORTELA-LINDOSO, A.A.B. e SHIKANAI-YASUDA, M.A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Rev. Saúde Pública.** v.37, n.1, p.107-115, 2003.

RABELLO, A.; LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, E.F.; GADELHA, M.F.; SANTOS, J.A. DOS; MELO, L. DE; SCHWIND, P. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay – ID-PaGIA Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, n.1, p.77-82, 1999.

RASSI, A.; AMATO NETO, V.; RASSI, G.G.; AMATO, V.S.; RASSI JR, A. LUQUETTI, A.O.; RASSI, S.G. Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.37, n.6, p. 485-489, 2004.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 3: Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas, p. 27-41.
RODRIGUES, V.L.C.C.; FERRAZ FILHO, A.N.; SILVA, E.O. da. *Triatoma rubrovaria* (Blanchart 1843): tábua de vida das ninfas, duração das formas e oviposição das fêmeas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, n.3, p.251-254, 2005.

RUAS NETO, A.L. e CORSEUIL, E. Hábitos, distribuição geográfica e potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Entomologia y Vectores.** v.9, n.2, p.231-249, 2002.
RUIZ-GARCIA, M.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.O.; ANGARITA, L.; ALVAREZ, D. Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. **Heredity.** v.85, n.4, p.318- 327, 2000.

SALOMONE, O.A. et al. *Trypanosoma cruzi* in Persons without Serologic Evidence of Disease, Argentina. **Emerg. Infect. Dis.** v.9, n.12, p. xxxx, 2003.

SANCHÉZ-GUILLÉN. M.C.; BARNABÉ, C.; JUEGAN, J.F.; TIBAYRENC, M.; VELÁSQUEZ-ROJAS, M.; MARTÍNEZ-MUNGUÍA, J.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; ROSAS-RAMÍREZ, M.; PÉREZ-FUENTES, R. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non endemic area of Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, n.7, p.947-952, 2002.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. **Nota de informação.** 31 mar. 2005.

SCHENONE, H.; GAGGERO, M.; SAPUNAR, J.; CONTRERAS, M.C.; ROJAS, A. Congenital Chagas Disease of Second Generation in Santiago, Chile. Report of Two cases. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 43 (4). São Paulo, 2001.

SHIKANAI YASUDA, M.A.; BRISOLA MARCONDES, C.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.P.; AMATO NETO, V. TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JUNIOR, E.R.; LOPES, M.H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.33, n.5, p.351-357, 1991.

SILVA, N.; O'BRYAN, L.; MEDEIROS, E.; HOLAND, H.; SULEIMAN, J.; MENDONÇA, J.S. DE; PATRONAS, N.; REED, S.G.; KLEIN, H.G.; MASUR, H.; BADARÓ, R. *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in HIV-infected patients. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.** v.20, n.4, p.342-349, 1999.

SILVEIRA, A.C. e VINHAES, M.C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** v.94, n.1, p.405-411, 1999.

SOBREIRA, A.C. de M.; GOMES, F.V.B.A.F.; SILVA, M.A.M. da; OLIVEIRA, M. de F. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Iguatu, CE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.34, n.2, p.193-196, 2001.

SOUSA, M.A. de. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.205-210, 1999.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.83, n.2, p.141-152, 1996.

STEINDEL, M. *Trypanosoma cruzi* Interaction with its Vectors and Vertebrate Hosts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.243-245, 1999.

STREIGER, M. FABBRO, D.; DEL BARCO, M.; BESTRAMINO, R.; BOVERO, N. Chagas congénito en la ciudad de Santa Fé. Diagnóstico y tratamiento. **Medicina.** v.55, n.2, p.125-132, 1995.

THOMAS, M.C.; LONGOBARDO, M.V.; CARMELO, E.; MARAÑÓN, C.; PLANELLES, L.; PATARROYO, M.E.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.C. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein – 11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. **Clin. Exp. Immunol.** v.123, n.3, p.465-471, 2001.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAIYASUDA, M.A.; DA SILVEIRA, J.F.; COTRIM, P.C.; PARANHOS, G.; KATZIN, A.M. *Trypanosoma cruzi*. Detection of a Circulating Antigen in Urine of Chagasic Patients Sharing Common Epitopes With an Immunodominant Repetitive Antigen. **Exp. Parasitol.** v.76, n.4, p.352-357, 1993.

UMEZAWA, E.S. e SILVEIRA, J.F. da. Serological Diagnosis os Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.285-288, 1999.

VILLELA, M.M.; SOUZA, J.B.; MELLO, V.P.; AZEREDO, B.V.de M.; DIAS, J.C.P. Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. **Cad. Saúde Pública.** v.21, n.3, p.878-886, 2005.

WINKLER, M.A.; BRASHEAR, R.J.; HALL, H.J.; SCHUR, J.D.; PAN, A.A. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoassay for confirmation of seroreactivity. **Transfusion.** v. 35, n.3, p.219-225, 1995.

ZAIDENBERG, M. La enfermedad de Chagas congenita en la Provincia de Salta, Argentina, años 1980-1997. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.32, n.6, p.689-695, 1999.

ZELEDÓN, R. Some Morphological and Molecular Aspects of the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Insect Vector. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.94, supl. I, p.217- 218, 1999.

ANEXOS

TRIAGEM CLÍNICA											
Preencher as quadrículas com S (sim) ou N (não)									1	2	3
1	Já doou sangue antes? (60/90 dias)										
2	Teve algum problema com a doação? Qual?										
3	Já recebeu sangue ou algum hemoderivado antes? (10 anos)										
4	Já teve algum dos seguintes problemas: doença de Chagas, hepatite, sífilis, infecção por HIV, infecção por HTLV/III, doença de Kreutzfeld/Jacob, úlcera péptica, sangramentos anormais, asma brônquica, epilepsia, convulsões ou desmaios após a infância?										
5	Teve ou tem diabetes, problemas cardíacos, pulmonares, renais, hematológicos, ou hepáticos, doenças auto-imunes, doenças de tireóide, hanseníase, tuberculose, câncer, doença alérgica ou qualquer outra doença grave a menos de 30 dias?										
6	Está gripado/resfriado agora? Quais são os sintomas?										
7	Está fazendo algum tratamento ou usando alguma medicação? [dentário: 72h; acupuntura: 12 meses; medicamentos (antibióticos e quimioterápicos antibacterianos, corticosteróides, anticoagulantes orais, hipoglicemiantes, antipsicóticos e antiinflamatórios; rejeição temporária, AAS]										
8	Fez uso de hormônio de crescimento de origem humana?										
9	Foi operado ou esteve internado em hospital nos últimos 3 meses? Por que? (grande cirurgia: 6 meses; pequena: 3 meses)										
10	Já esteve preso ou internado em colônias de recuperação de drogados ou doentes mentais?										
11	Tem tido diarreia, infecções ou lesões de pele, febre persistente ou suores noturnos?										
12	Perdeu peso ultimamente? (10% em três meses)										
13	Mulheres: está ou esteve grávida recentemente? (3 meses) Está amamentando?										
14	Já viajou para região do Amazonas? (6 meses) Teve malária nos últimos anos? (3 anos ou definitivo se infectado por P. Malariae - febre quartã)										
15	Fez alguma vacina ou imunização passiva? Qual? [48h: meningite, peste, pneumococo, cólera, difteria, hepatite B (não derivada do plasma), influenza, febre tifóide (injetável), haemophilus influenza, tétano e pólio (Salk); 3 semanas: poliomielite (oral), febre tifóide (oral), caxumba, febre amarela, sarampo e BCG; 4 semanas: rubéola e varicela; 1 ano: anti-rábica e hepatite B (derivada do plasma);]										
16	Fez alguma tatuagem recentemente? (1 ano)										
17	Você fuma? Que hora fumou o último cigarro? (1 hora antes e 1 hora depois)										
18	Você tomou bebida alcoólica nas últimas 12 horas? Toma diariamente?										
19	Em seu trabalho ou esporte há risco de acidentes? (trabalho em altura, com armas, com máquinas pesadas ou de corte, motoristas de ônibus, paraquedistas, etc: 12 a 24 horas de afastamento após a doação)										
20	Alimentou-se nas últimas 4 horas? (jejum máximo: 4 horas; se a alimentação for muito gordurosa: aguardar 4 horas)										
21	Teve contato sexual com alguém que estava com hepatite? (6 meses)										
22	Já teve contato sexual com alguma pessoa pertencente aos grupos de risco para doenças venéreas ou suspeita de estar contaminada HIV?										
23	Têm tido contatos sexuais com garotos(as) de programa?										
24	Você troca frequentemente de parceiro(a) sexual?										
25	Homens: Teve alguma relação homossexual a partir de 1977?										
26	Teve contato sexual com pessoa que não seja seu/sua parceiro(a) habitual nos últimos 6 meses, sem camisinha?										
27	Você usou drogas (tóxicos) injetáveis nos últimos 10 anos?										

	Peso (kg)	ta (mm Hg)	fc (bpm)	temp (°C)	apto	inapto	volume (ml)	motivo (código e descrição)	médico
1									
2									
3									

OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

TERMO DE RESPONSABILIDADE E AUTORIZAÇÃO	Assinatura do doador
Declaro que entendi todas as perguntas que me foram feitas nesta entrevista e que minhas respostas são verdadeiras. Autorizo a coleta de meu sangue, neste momento, para uso em transfusão a critério do Hemocentro. Declaro ainda que estou ciente de que em meu sangue serão feitos testes apenas para triagem das doenças infecto-contagiosas transmitidas pelo sangue, podendo ocorrer resultados "falsos positivos".	1
	2
	3

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](#)