

CLÁUDIA DAMBROSKI PARTEL

**DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA
IMUNOENZIMÁTICA (ELISA) RÁPIDA E QUANTITATIVA
PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS**

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de
Mestre em Medicina, na Área de Clínica Médica.*

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

*Campinas
1996*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
 Nº CHEQUEADO TIUNICAMP
 V. 1 E. 1
 TOMBO 30451
 PRCC. 281197
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 23/05/97
 Nº CPD CM-00092093-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP**

Partel, Cláudia Dambroski

P258d **Desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática (ELISA) rápida e quantitativa para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas / Cláudia Dambroski Partel. Campinas, SP : [s.n.], 1996.**

Orientador: Cláudio Lúcio Rossi

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Chagas. 2. Imunodiagnóstico. 3. Anticorpos. I. Cláudio Lúcio Rossi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Lúcio Rossi

Membros:

1. Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi



2. Profª Dra. Adelma José Vaz -



3. Profª Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Sandra Cecília Botelho Costa

Curso de pós-graduação em Medicina, Área de Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/12/95

*Aos meus pais e ao meu esposo Cláudio,
pelo carinho e compreensão.*

Aos meus filhos, Tomás e Gabriel.

*Este trabalho foi financiado pela Fundação
Banco do Brasil (proc. nº 10 - 4335 / 93)*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, pela orientação, apoio e compreensão.

Ao Departamento de Patologia Clínica, ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio à realização do presente trabalho.

Aos funcionários da Secção de Imunologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela cooperação e estímulo.

À Sílvia Concentina M. Panebianco, secretária do Departamento de Patologia Clínica, pela cooperação.

Ao Jorge Airton Cicala, funcionário do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela cooperação.

A Neiva Sellan Lopes Gonçalves, responsável pelo Laboratório de Sorologia do Hemocentro/UNICAMP, pela cooperação.

Ao Dr. Antônio Vitor Ramos de Souza, pelo incentivo e colaboração

A Fundação Banco do Brasil, pelo apoio financeiro à realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL, MÉTODOS E CASUÍSTICA.....	13
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	52
7. SUMMARY.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

- Figura 1. Titulação do extrato bruto de *T. cruzi* (EB-SST) por ELISA. As esferas de poliestireno foram revestidas com diferentes concentrações do EB-SST. O conjugado foi diluído a 1:500 em PBS - Tw. TMB / H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm..... 27
- Figura 2. Titulação da fração II do EB-SST purificada por cromatografia de troca iônica. As esferas de poliestireno foram revestidas com diferentes concentrações da fração II. O conjugado foi diluído a 1:500 em PBS-Tw. TMB/H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm..... 28
- Figura 3. Titulação do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase). As esferas de poliestireno foram revestidas com EB-SST contendo 3 µg de proteína/ml. Diferentes diluições do conjugado foram testadas. TMB / H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm..... 29
- Figura 4. Resultados da pesquisa de IgG anti- *T.cruzi* por ELISA em 50 pacientes com Doença de Chagas, 58 pacientes com infecções heterólogas e 20 pessoas sadias..... 32
- Quadro I Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB-SST e frações obtidas por cromatografia em Sepharose 4B lentil-lectina..... 30
- Quadro II. Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB-SST e frações obtidas por cromatografia em DEAE-Sephacel..... 31

Quadro III. Pesquisa de anticorpos anti <i>T.cruzi</i> em pacientes com Doença de Chagas..	33
Quadro IV. Pesquisa de anticorpos anti <i>T.cruzi</i> em pacientes com infecções heterólogas.....	35
Quadro V. Pesquisa de anticorpos anti <i>T.cruzi</i> em pessoas sadias.....	38
Quadro VI. Rendimento das frações obtidas por cromatografia do EB-SST em DEAE-Sephacel.....	40



Resumo

A Doença de Chagas, infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, em pessoas imunocompetentes é, geralmente, assintomática ou se apresenta associada com manifestações clínicas leves e não específicas. Os pacientes com infecção crônica podem apresentar anormalidades cardíacas e/ou digestivas severas, mas estas manifestações clínicas são, usualmente, precedidas por muitos anos de infecção assintomática. Deste modo, a suspeita clínica da infecção, além de levar em consideração aspectos epidemiológicos, deve ser confirmada por dados laboratoriais.

O diagnóstico da fase crônica da infecção chagásica é, geralmente, baseado na presença de níveis significativos de anticorpos específicos, desde que a detecção de parasitas circulantes é, frequentemente, difícil, em consequência dos baixos níveis de parasitemia.

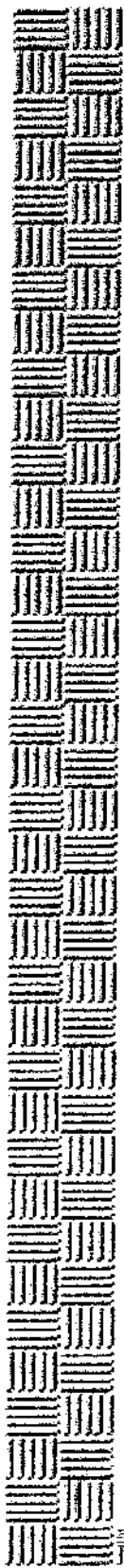
O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática (ELISA) rápida e quantitativa para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas. Considerando que o desempenho de uma técnica imunológica depende, em grande parte, da preparação antigênica utilizada, o extrato bruto de *T. cruzi* foi fracionado por cromatografias de afinidade (Sephacel 4B-lentil-lectina) e de troca iônica (DEAE-Sephacel), na tentativa de se encontrar frações com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada. Uma fração do parasita obtida por cromatografia em DEAE-Sephacel foi selecionada com base na reatividade apresentada com soros de pacientes com Doença de Chagas e leishmaniose.

A técnica ELISA foi padronizada utilizando um sistema comercial para reações imunoenzimáticas - "Falcon assay screening test" (FAST-ELISA®). Este sistema é constituído por placas apropriadas para todos os passos da reação, incluindo uma placa que possui uma tampa de plástico onde estão fixadas 96 esferas de poliestireno que se encaixam nos orifícios de placas de microtitulação. Na realização do teste, a tampa com esferas revestidas com a preparação antigênica de *T. cruzi* foi transferida, sucessivamente, após as lavagens necessárias, para as placas contendo as amostras de soros sendo testadas, o conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase) e o sistema substrato

(tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio). Nas incubações com os soros, conjugado e substrato (5 minutos cada, à temperatura ambiente) as placas foram colocadas sobre um aparelho com movimentos orbitais e agitadas continuamente. As absorbâncias das reações foram medidas a 630 nm na placa contendo o substrato. Em todos os ensaios, foram incluídos soros padrões contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-*T.cruzi*, em termos de unidades de atividade por ml (U/ml). Cada soro foi testado em triplicata e a absorbância média foi transformada em U/ml utilizando a curva padrão.

Em um estudo comparativo, anticorpos IgG anti-*T.cruzi* foram pesquisados com as técnicas de ELISA e IFI em 50 pacientes chagásicos crônicos, 58 pacientes com infecções heterólogas e em 20 pessoas sadias. A técnica ELISA apresentou sensibilidade de 98% e especificidade de 99%, enquanto que a sensibilidade e a especificidade obtidas com a reação de IFI foram, respectivamente, 92% e 96%.

O bom desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, mais a simplicidade e rapidez, evidenciam que a técnica de ELISA, por nós desenvolvida, pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas.



1. Introdução

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma doença endêmica na grande maioria dos países da América Latina. Inquéritos sorológicos realizados na década passada evidenciaram que cerca de 24 milhões de pessoas eram soropositivas para o parasita, com mais de 65 milhões vivendo em áreas endêmicas (DIAS, 1987; WHO, 1991). No Brasil, estimativas feitas no final da década passada indicavam que cerca de 5 milhões de pessoas estavam contaminadas com *T. cruzi* e que o número absoluto de óbitos na década atribuídos à infecção era, aproximadamente, 6000/ano (DIAS, 1987; SILVEIRA & RESENDE, 1994).

A transmissão vetorial, por meio de insetos da sub-família *Triatominae*, é o mecanismo primário de difusão da Doença de Chagas. O homem torna-se infectado quando as formas tripomastigotas do parasita, liberadas com as fezes do inseto à medida que este se alimenta, conseguem penetrar no seu corpo através de escarificações presentes na pele e/ou através da lesão causada pela picada do triatomíneo. Após a penetração, as formas tripomastigotas invadem as células próximas à porta de entrada onde se transformam em formas amastigotas que se multiplicam por fissão binária no citoplasma celular. Após vários ciclos reprodutivos (3 a 5 dias), as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas que são liberadas para os tecidos vizinhos à medida que ocorre ruptura das células infectadas. Os parasitas podem, então, invadir células próximas ao local de sua liberação ou podem ser transportados para tecidos distantes, via corrente sanguínea, iniciando, portanto, novos ciclos de multiplicação, com a consequente destruição celular. Vários tecidos podem ser parasitados, mas os pseudocistos contendo as formas amastigotas são mais frequentemente encontrados em fibras musculares e cardíacas (SCOTT & SNARY, 1982). A transmissão do *T. cruzi* pela transfusão de sangue é considerada a segunda via mais frequente de contaminação em áreas onde ocorre a transmissão ativa pelo inseto vetor e a principal via de infecção nas áreas urbanas onde a parasitose não é endêmica (DIAS, 1987; TEIXEIRA, 1987).

A infecção congênita com *T. cruzi* pode, também, ser considerada uma via importante de transmissão da Doença de Chagas em certas regiões geográficas. Estudos realizados em algumas regiões endêmicas no Brasil têm mostrado que a incidência de

transmissão congênita da Doença de Chagas entre mães portadoras da infecção pode ser da ordem de 10% (BITTENCOURT et al., 1972). Outras vias de infecção com *T.cruzi*, tais como a transmissão por transplante de órgãos (CHOCAIR et al., 1981; FIGUEIREDO et al., 1990; DIAS et al., 1992; FERRAZ & FIGUEIREDO, 1993) e por acidentes de laboratório (DIAS, 1992), têm, também, sido descritas. O *T.cruzi* é raramente encontrado no colostro e/ou leite de mulheres infectadas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1991), “a transmissão da Doença de Chagas pelo colostro e/ou leite materno parece improvável, não havendo, portanto, razões que impeçam a amamentação por parte de mulheres infectadas” (DIAS, 1992).

A grande maioria das pessoas imunocompetentes com Doença de Chagas aguda ou crônica é assintomática ou apresenta manifestações clínicas brandas e não específicas

A fase aguda da infecção chagásica caracteriza-se por alta parasitemia sanguínea e intenso parasitismo ao nível dos tecidos (SCOTT & SNARY, 1982; TEIXEIRA, 1987). Nos casos com manifestações clínicas, podem ser observados uma série de sintomas não específicos, entre os quais salientam-se: febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, dor muscular, taquicardia e anemia (SCOTT & SNARY, 1982; TANOWITZ et al., 1982). Casos agudos com aumento da área cardíaca e miocardite, também, têm sido descritos (SCOTT & SNARY, 1982). Os sinais da porta de entrada do parasita, como o chagoma de inoculação na pele e o sinal de Romana na pálpebra, são pouco frequentes em nosso meio (TEIXEIRA, 1987). A duração da fase aguda da Doença de Chagas no homem varia de 1 a 2 meses, e a diminuição do número de parasitas circulantes deve-se, provavelmente, ao desenvolvimento de imunidade humoral e celular (SCOTT & SNARY, 1982).

A infecção chagásica, quando não fatal na fase aguda, evolui para uma fase crônica. Os pacientes com infecção crônica podem exibir anormalidades cardíacas e/ou digestivas severas, mas estas manifestações clínicas são, geralmente, precedidas por muitos anos de infecção assintomática. Prata (1990), baseando-se em critérios clínicos, evolutivos e de prognóstico, considera as seguintes formas crônicas da Doença de Chagas: forma

indeterminada, forma cardíaca, forma digestiva, forma nervosa e forma com exacerbações agudas. Na forma indeterminada, as pessoas apresentam sorologia compatível com a infecção chagásica, algumas com xenodiagnóstico positivo. Os exames complementares convencionais (RX, ECG) são normais, mas estudos histopatológicos do coração já podem revelar lesões miocárdicas discretas, qualitativamente semelhantes às da forma cardíaca crônica. A forma cardíaca é caracterizada por uma cardiomiopatia dilatada com predomínio das manifestações clínicas de insuficiência cardíaca. Nesta forma podem, também, ocorrer distúrbios de condução, de repolarização ventricular e extra-sístoles, com elevada frequência de morte súbita. A forma digestiva caracteriza-se pelo envolvimento de vísceras ocas, sendo acometidos principalmente o esôfago e o cólon, com os pacientes apresentando graus variados de acalasia, com dilatação e espessamento da paredes destes órgãos. A forma nervosa caracteriza-se pelo comprometimento do sistema nervoso associado com a desnervação. Em algumas pessoas com a forma crônica da doença, o comprometimento do sistema imune pode induzir um quadro clínico semelhante aquele observado na fase aguda da infecção. Nos últimos anos, a forma crônica com exacerbações agudas adquiriu maior importância, pelo número crescente de casos relacionados à imunossupressão, seja por doenças que resultam em comprometimento do sistema imune, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou pelo uso de imunodepressores por pessoas transplantadas ou portadoras de neoplasias hematológicas ou de doenças que acometem as linhagens linfocitárias. Nos casos de reativação da infecção, os parasitas podem ser detectados no sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos, na ausência de anticorpos específicos da classe IgM (KOHL et al., 1982; LEIGUARDA et al., 1990).

Na fase aguda da infecção chagásica, o diagnóstico pode ser efetuado pela pesquisa direta do parasita no sangue das pessoas supostamente infectadas, podendo o exame ser feito a fresco, em gota espessa, ou em esfregaço corado (SCOTT & SNARY, 1982; TEIXEIRA, 1987). Quando os parasitas não são detectados por estes métodos, pode-se inocular amostras de sangue ou papa de leucócitos em camundongos e examinar amostras de sangue dos animais, a cada dois ou três dias. Amostras de sangue ou papa de leucócitos obtidas de pessoas com suspeita de infecção podem, também, ser inoculadas em

meio líquido, sendo os parasitas, nos casos positivos, observados microscópicamente nas culturas após algumas semanas (TANOWITZ et al., 1992).

Alguns poucos estudos sugerem que antígenos de *T.cruzi* podem ser facilmente detectados no soro e na urina de pacientes com infecção chagásica aguda. Freilij et al. (1987), por exemplo, foram capazes de detectar antígenos de *T.cruzi* em amostras de urinas concentradas e de soros de todos os dez casos de infecção chagásica aguda estudados.

O xenodiagnóstico é um dos métodos mais sensíveis para a identificação da fase aguda da infecção chagásica. Neste método, permite-se que triatomíneos, criados em laboratório, alimentem-se com o sangue de pessoas com suspeita clínica da infecção. Algumas semanas depois, examina-se o conteúdo intestinal dos insetos na tentativa de detecção do parasita.

Nos estágios crônicos da infecção, devido a parasitemia subpatente, os métodos de demonstração do parasita não oferecem bons resultados. O xenodiagnóstico, por exemplo, é positivo em, aproximadamente, 50 % dos pacientes (TANOWITZ et al., 1992). Em alguns casos, várias repetições do teste são necessárias para se obter um resultado positivo (SCOTT & SNARY, 1982). Outra desvantagem do método é o longo período requerido para se obter os resultados, em média 40 dias (SCOTT & SNARY, 1982; TANOWITZ et al., 1992). Além disto, reações alérgicas podem, também, ocorrer em indivíduos que são testados frequentemente (COSTA et al., 1981).

Os resultados da pesquisa de antígenos de *T.cruzi* no sangue ou em outros fluidos biológicos na fase crônica da infecção chagásica, até o presente momento, não são muito animadores. Antígenos de *T.cruzi* têm sido detectados em 50% a 82% das amostras de soros e em 32% a 93% das amostras de urina de pacientes chagásicos crônicos (ARAÚJO, CHIARI & DIAS, 1981; KATZIN et al., 1989; FERREIRA, 1992; TANOWITZ et al., 1992). Convém, entretanto, ressaltar que a pesquisa de antígenos do parasita pode ser muito útil em casos com forte suspeita clínica da infecção apresentando sorologia negativa ou duvidosa (FERREIRA, 1992; TANOWITZ et al., 1992). A detecção

de antígenos pode ser, particularmente, importante em pacientes apresentando comprometimento da resposta imune ou submetidos à terapia imunossupressora. Além disto, alguns estudos indicam que a pesquisa de antígenos de *T.cruzi* pode contribuir para a avaliação do tratamento da infecção (FERREIRA, 1992).

A detecção de anticorpos específicos é, ainda, o melhor e mais utilizado método para a identificação da infecção crônica por *T.cruzi*.

Várias reações têm sido utilizadas para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas, entre as quais salientam-se: reação de fixação de complemento (RFC); reação de aglutinação direta (AD); reação de hemaglutinação passiva (HP); reação de imunofluorescência indireta (IFI) e as reações imunoenzimáticas (ELISA).

Logo após a identificação da doença por Carlos Chagas, em 1909, Guerreiro e Machado (1913), utilizando extratos aquosos de órgãos de cães jovens infectados com *T.cruzi*, desenvolveram a primeira RFC para o diagnóstico da Doença de Chagas. À medida que esta reação passou a ser utilizada, uma série de reações cruzadas foram observadas com soros de pacientes com outras infecções e mesmo com soros de pessoas sadias. A partir de meados da década de 30, uma série de modificações relacionadas à obtenção de extratos de *T.cruzi* a partir de formas de cultura do parasita (KELSER, 1936) e à extração de antígenos do mesmo com solventes orgânicos (ROMAÑA & DIAS, 1942; FREITAS & ALMEIDA, 1949; CHAFFEE, FIFE & KENT, 1956), foram descritas. Estas modificações reduziram significativamente a reatividade cruzada observada com soros de pessoas sadias e com infecções heterólogas, mas reações cruzadas continuaram a ser observadas, principalmente com soros de pacientes com leishmaniose. A RFC, embora sendo uma reação de baixa sensibilidade e difícil de padronizar, pela quantidade e tipo dos reagentes envolvidos, foi, até recentemente, a única técnica utilizada para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas em muitos laboratórios, principalmente os de banco de sangue. Cumpre, ainda, ressaltar que, a RFC não permite a distinção entre anticorpos específicos das classes IgM e IgG.

A reação de AD para Doença de Chagas foi descrita por Muniz e Freitas, em 1944, utilizando formas de cultura vivas do *T.cruzi*. Em 1971, Vattuone e Yanovsky descreveram um teste de AD utilizando formas epimastigotas, tripsinizadas e formolizadas.

Desde a sua descrição, a alta sensibilidade da técnica de AD tem sido evidenciada em vários estudos comparativos com outras técnicas imunológicas. Entretanto, somente a modificação efetuada por Storni, Bolsi e Yanovski, em 1975, referente ao tratamento prévio dos soros com 2-mercaptoetanol (2-ME), para a eliminação de anticorpos naturais da classe IgM que ocasionavam reações falso - positivas, fez com que a reação adquirisse especificidade aceitável. A reação de AD, ainda hoje, é bastante utilizada para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas. Cumpre ressaltar que a reação de AD pode apresentar dificuldades com relação à leitura dos resultados. Além disto, devido ao tratamento prévio dos soros com 2-ME, a técnica não é capaz de detectar anticorpos específicos da classe IgM.

A reação de HP para Doença de Chagas foi descrita na segunda metade da década de 60 (KNIERIM & SAAVEDRA, 1966; CERISOLA, FATALA CHABEN & LAZZARI, 1967; KNIERIM & RUBINSTEIN, 1970). Na década de 70, vários pesquisadores desenvolveram técnicas de HP para a detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* e mostraram a utilidade das mesmas por meio de estudos comparativos com outras técnicas já estabelecidas. Neste particular, sobressai o trabalho de CAMARGO, HOSHINO & SIQUEIRA, em 1973, mostrando a similaridade de resultados obtidos com as técnicas de HP, RFC e IFI. Neste trabalho, as reações de HP foram realizadas com eritrócitos humanos (O, Rh⁺) formolizados revestidos com um extrato bruto de formas epimastigotas de *T.cruzi*. Trabalhos subsequentes mostraram que, embora com alta especificidade, a sensibilidade da reação de HP, em muitos casos, é menor do que aquela obtida com outras técnicas convencionais (LUQUETTI, 1990). Entretanto, a simplicidade de execução, aliado ao fato da técnica não requerer equipamentos sofisticados, faz com que a reação de HP seja atualmente muito utilizada, tanto em laboratórios de rotina como em estudos soroepidemiológicos (FERREIRA, 1992). Entretanto, é importante ressaltar, com base em nossa experiência laboratorial, que os resultados obtidos com diferentes lotes de alguns kits comerciais estão sujeitos a uma variação acima do esperado.

Fife e Mushel, em 1959, utilizando formas epimastigotas de *T.cruzi*, descreveram a reação de IFI para a pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi*. Embora seja sabido que títulos de IFI significativamente maiores são obtidos com as formas tripomastigotas e amastigotas (FERREIRA,1992), a técnica atualmente utilizada tem como modelo o trabalho original de Camargo, publicado em 1966, utilizando formas epimastigotas formolizadas fixadas em áreas pré-determinadas de lâminas de microscopia. A reação de IFI, dada a simplicidade de execução, é uma das técnicas atualmente mais utilizadas em laboratórios equipados com microscópios de fluorescência. Convém ressaltar que, embora com alta sensibilidade, a especificidade da reação de IFI não é a ideal, visto que reações cruzadas são frequentemente observadas com várias infecções heterólogas, principalmente com leishmaniose. Além disto, dada a subjetividade da leitura, resultados discordantes podem ser encontrados com soros apresentando nível de reatividade próximos ao valor do “cut-off” estabelecido para a técnica.

A primeira reação imunoenzimática desenvolvida para a pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* foi descrita por Voller et al., em 1975. A reação foi realizada em placas de poliestireno com orifícios revestidos com um extrato bruto de *T.cruzi* e um conjugado contendo anticorpos anti-imunoglobulina humana marcados com fosfatase alcalina foi utilizado para a identificação dos anticorpos específicos. Os autores observaram uma relação direta entre os níveis de anticorpos e a intensidade da coloração das reações.

As técnicas imunoenzimáticas vêm sendo cada vez mais utilizadas para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas. Entretanto, a grande maioria destas técnicas, além de demoradas, fornecem, apenas, resultados qualitativos ou, no máximo, semi-quantitativos, pois os tempos de reação escolhidos para a leitura das reações excedem em muito a porção linear da reação de conversão do substrato. Em uma reação enzimática, a concentração de enzima é linear com respeito à atividade (velocidade da reação) somente durante a breve fase inicial da reação, quando a concentração da enzima é muito menor do que a do substrato (TSANG, WILSON & PERALTA, 1983; HANCOCK & TSANG,

1986; MADDISON, 1987). Deste modo, a determinação do intervalo de tempo adequado para a leitura das reações, após a adição do sistema substrato, é uma exigência fundamental para a caracterização da técnica como quantitativa. Com o intuito de minimizar as variações inerentes às técnicas imunoenzimáticas, é essencial incluir em cada placa de reação uma série de soros padrões com níveis conhecidos de anticorpos em termos de unidades de atividade por ml (U/ml) e transformar as absorbâncias obtidas em U/ml utilizando a curva gerada pelo ensaio dos referidos padrões. Além disto, é, também, fundamental a padronização da técnica com excesso de todos os reagentes, exceto aquele sendo testado.

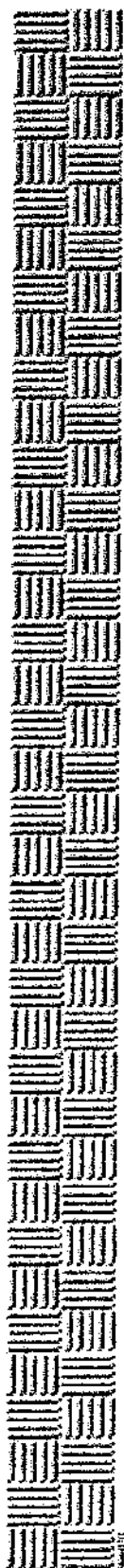
O sistema "Falcon assay screening test"(F.A.S.T.) da Becton & Dickinson (New Jersey, USA), permite o desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas rápidas. O sistema F.A.S.T. tem sido utilizado por outros autores para a identificação de anticorpos monoclonais (SCHEINBERG et al., 1983) e para a pesquisa de anticorpos específicos em doenças infecciosas e parasitárias, incluindo infecções virais de perus (IANCONESCU, 1985), esquistossomose mansônica (HANCOCK & TSANG, 1986), malária (CAMPBELL et al., 1987), fasciolíase (HILLYER & GALLANES, 1991) e leishmaniose visceral canina (ASHFORD et al., 1993). A técnica ELISA utilizando o sistema F.A.S.T. (FAST-ELISA), descrita por Hancock e Tsang (1986) para a pesquisa de anticorpos anti-*S.mansoni*, apresenta todos os requisitos necessários a um procedimento quantitativo para a pesquisa de anticorpos específicos.

Uma grande variedade de preparações antigênicas tem sido utilizada em técnicas imunoenzimáticas desenvolvidas para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas, incluindo extratos brutos do parasita (VOLLER et al., 1975; MAGNAVAL et al., 1985; FERREIRA et al., 1991), antígenos purificados por cromatografia de afinidade utilizando lectinas (SCHECHTER et al., 1983; SCHECHTER et al., 1985; GUHL, 1990; SCHARFSTEIN et al., 1986) ou anticorpos monoclonais (SNARY et al., 1981; TACHIBANA, NAGAKURA & KANEDA, 1988), filtração em gel (SCHECHTER et al., 1986) ou peptídeos sintéticos obtidos por meio de técnicas de biologia molecular (LUQUETTI, 1990; FRANCO DA SILVEIRA, 1992).

A utilização de antígenos como reagentes sorológicos, para a pesquisa de anticorpos específicos, requer que os mesmos possuam algumas características. Neste particular, é importante que os antígenos sejam obtidos em quantidades suficientemente grandes com relativa facilidade, sejam estáveis sob condições usuais de estocagem, contenham componentes antigênicos reconhecidos pelo maior número possível de pessoas infectadas, não apresentem ou apresentem quantidades mínimas de componentes capazes de serem reconhecidos por anticorpos induzidos por infecções heterólogas e tenham compatibilidade com o sistema de análise empregado (TSANG et al., 1983).

Como já salientado, embora as formas amastigotas e tripomastigotas encontradas nos mamíferos sejam as mais reativas, as formas epimastigotas, encontradas no inseto vetor, são comumente as mais utilizadas para a obtenção de antígenos, dada a relativa facilidade com que as mesmas são cultivadas em meios de cultura relativamente simples.

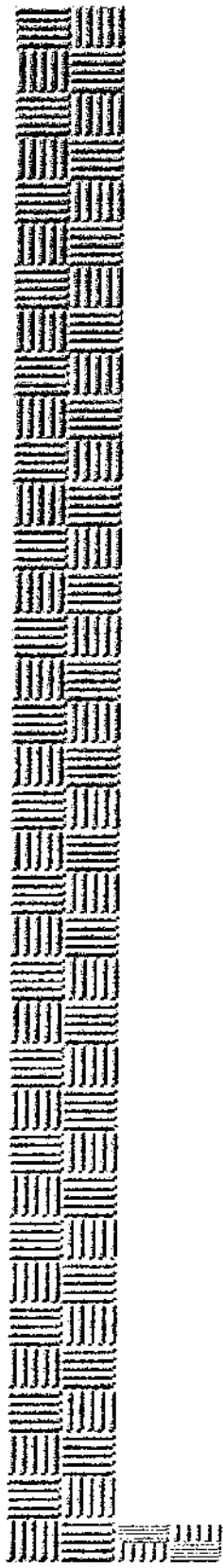
A utilização de extratos brutos de *T.cruzi* tem ocasionado uma série de problemas, entre os quais destacam-se os resultados falso-negativos e falso-positivos. Entre os fatores responsáveis pela sorologia negativa em pacientes chagásicos destacam-se : a) o limite de sensibilidade da técnica utilizada; b) a variabilidade de constituintes entre as diferentes cepas de *T.cruzi* e entre os vários estágios do parasita (BONGERTS & DVORAK, 1983; PLATA, GARCIA PONS & EISEN, 1984; RANGEL-ALDAO et al., 1986); c) a resposta imune do hospedeiro (TRISCHMANN et al., 1978; ISRAELSKI, SADLER & ARAUJO, 1988). Com relação aos resultados falso-positivos, um dos maiores desafios com relação a sorologia da Doença de Chagas é a expressão no *T.cruzi* de componentes antigênicos que são reconhecidos por anticorpos induzidos contra outros agentes infecciosos (ARAUJO, 1992; STOLF, 1992). Particularmente importante é a reatividade cruzada observada entre Doença de Chagas e leishmaniose, visto que em grandes áreas geográficas as duas parasitoses são endêmicas (DIAS, 1992). Deste modo, para o desenvolvimento de técnicas imunológicas para o diagnóstico da Doença de Chagas, é essencial fracionar o extrato bruto de *T.cruzi* , na tentativa de se encontrar frações que apresentem alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada.



2. Objetivos

Os objetivos do presente projeto são:

1. Obtenção de uma preparação antigênica de *T.cruzi*, com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada.
2. Desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática quantitativa rápida para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas com alta sensibilidade e especificidade.



3. Material, Métodos e Casuística

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes usados

Acetato de sódio, ácido acético glacial, ácido clorídrico, azida sódica, azul de Evans, carbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etilenodiaminotetraacetato de sódio (EDTA), fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, glicerina, glicose, hemina e isopropanol (E. Merck, Darmstadt, Germany); infusão de fígado e triptose (Difco Laboratories, Detroit, USA); soro fetal bovino (WL Imunoquímica, Rio de Janeiro, Brasil); antígeno de *T. cruzi* para IFI e anti-IgG humana marcada com fluoresceína (Biolab Diagnóstica S.A., Rio de Janeiro, Brasil); alfa-D-metil-manopiranosídeo, anti-IgG humana marcada com peroxidase, DEAE-Sephacel, fluoreto de fenilmetilsulfonila (FFMS), leupeptina, Sepharose 4B-lentil-lectina, tetrametilbenzidina (TMB), tween 20 e uréia (Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA); peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tris-(hidroximetil)-aminometano (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA); " kit " para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, USA); antígeno metílico de *T. cruzi* para RFC (Lio-Serum, Ribeirão Preto, Brasil); hemolisina (Cecon, São Paulo, Brasil); tampão barbital (Celm, São Paulo, Brasil).

2. Preparação dos antígenos de *T. cruzi*

2.1. Obtenção de formas epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas em meio de cultura líquido-" Liver-Infusion Tryptose Medium "(LIT), enriquecido com 10% de soro bovino fetal (YAGER, 1960; CHIARI, 1992). Após incubação, durante sete dias, a 28°C, os parasitas foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfatos 0,15 M, pH=7,2 (SST) estéril, utilizando centrifugações a 500.g, a 5°C, por 20 minutos. O precipitado resultante da última centrifugação foi ressuspenso em volume conhecido de

SST estéril e a concentração de parasitas foi determinada por meio de contagem em câmara de Newbauer. As suspensões finais de *T. cruzi* foram mantidas a -70°C até o momento do uso.

2.2. Obtenção dos extratos brutos de *T. cruzi*

As suspensões de *T. cruzi* foram descongeladas e submetidas à sonicação (Sonicador Branson, modelo SX - B30), em banho de gelo, por três minutos (1 minuto de sonicação/1 minuto de pausa), com tempo de pulso de 20 segundos e potência ajustada em 3. Para cada ml de material sonicado, acrescentou-se 1 µl de fluoreto de fenilmetilsulfonila (FFMS) a 0,25 M em isopropanol e 1 µl de leupeptina a 0,1% em água destilada. O material foi deixado, então, sob agitação lenta e contínua, a 4 °C, durante 15 horas, para a extração dos antígenos, sendo, a seguir, centrifugado a 48 000.g, a 4 °C, por 30 minutos (centrífuga refrigerada Beckman, rotor 75 Ti). Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e passado através de filtros Millex® com tamanhos de poros 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, USA). Este material, chamado de extrato bruto obtido com SST (EB- SST), foi aliqotado e mantido a -70°C até o momento do uso. O precipitado resultante da centrifugação foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 0,05 M pH= 8,0, contendo 8M de uréia. O material foi sonicado, como previamente descrito, e deixado sob agitação lenta, a 4°C, durante 2 horas. Após centrifugação, a 48 000.g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e submetido à cromatografia de exclusão em coluna PD-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH= 8,0. Este material, chamado de extrato bruto obtido com uréia (EB-U), foi aliqotado e mantido a -70°C até o momento do uso.

2.3. Fracionamento do EB-SST através de cromatografia de afinidade

O extrato bruto de *T.cruzi* obtido com SST (EB-SST), foi submetido à cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose 4B - lentil - lectina. As cromatografias de afinidade foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Garvey, Cremer e Sussdorf (1977), com algumas modificações. Resumidamente, o EB-SST foi previamente equilibrado com tampão Tris-HCl 0,05 M pH = 8,0 contendo 0,1M de NaCl (tampão Tris-HCl / NaCl), utilizando cromatografias de exclusão em colunas PD-10. A Sepharose 4B - lentil-lectina foi transferida para uma coluna de vidro com placa porosa e lavada, à temperatura ambiente, sucessivamente, com a quantidade adequada de cada uma das seguintes soluções: tampão Tris-HCl / NaCl, tampão Tris-HCl / NaCl contendo 0,25 M de alfa-D-metil-manopiranosídeo (tampão Tris-HCl / NaCl / MM) e tampão Tris-HCl/ NaCl. Após a lavagem, o fluxo da coluna foi interrompido quando o tampão cobria superficialmente o gel. Foram, então, adicionados 3 ml do material a ser cromatografado, contendo 3 mg de proteína/ml. (para cada 3 mg de proteína foram utilizados 1ml de gel). A mistura foi incubada, por 10 minutos, à temperatura ambiente e, por 2 horas, a 4°C, com agitação ocasional, com auxílio de um pequeno bastão de vidro. Após a incubação, o fluxo da coluna foi normalizado e o efluente coletado em frações de 1,5 ml por tubo, sendo a densidade óptica (D.O) de cada fração determinada por leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 280 nm. Após a entrada do material na resina, continuou-se adicionando tampão Tris-HCl / NaCl, até obter-se frações com D.O iguais a zero. As frações nas quais houve detecção de proteínas foram misturadas, sendo o volume final chamado de Fração A. Após a lavagem com tampão Tris HCl / NaCl, o fluxo da coluna foi interrompido sendo adicionado ao gel tampão Tris-HCl/ NaCl / MM. A mistura foi, então, mantida, por 2 horas, a 4°C, com agitação ocasional. Após esta incubação, o fluxo da coluna foi normalizado e o efluente coletado, como descrito anteriormente, até obter-se frações com D.O. iguais a zero. As frações nas quais houve detecção de proteínas foram misturadas, sendo o volume final chamado de Fração B.

As frações A e B foram concentradas utilizando membranas YM-10 (Amicon Corporation, Danvers, USA), em um sistema de ultrafiltração com pressão positiva. Após

determinação das concentrações proteicas, as frações foram aliquotadas e mantidas a -70°C até o momento do uso.

2.4. Fracionamento do EB - SST através de cromatografia de troca iônica

O extrato bruto de *T.cruzi* (EB-SST) foi submetido à cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-Sephacel. O EB-SST foi equilibrado com tampão Tris-HCl 0,02 M pH = 8,1 (tampão de equilíbrio), utilizando cromatografias de exclusão em colunas PD-10. A resina foi equilibrada com o mesmo tampão por meio de lavagem em coluna de vidro com placa porosa. Volumes iguais (6,5 ml) do EB-SST, contendo 2,5 mg de proteína/ml, e de DEAE-Sephacel foram misturados em um becker. Após incubação, a 4°C, por 75 minutos, com agitação periódica, a mistura foi transferida para uma coluna de vidro com placa porosa. O efluente foi coletado em frações de 1,5 ml/tubo, sendo a absorbância de cada fração determinada por leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 280 nm. Após a entrada do EB-SST na resina, continuou-se adicionando o tampão de equilíbrio até obter-se frações com densidades óticas (D.O) iguais a zero. As frações nas quais houve detecção de proteínas foram misturadas, sendo o volume final (22,5 ml) chamado de Fração I. Após esta primeira eluição, o fluxo da coluna foi interrompido e adicionou-se à resina 5 ml do tampão de equilíbrio contendo 0,25M de NaCl. O material foi deixado, a 4°C, por 75 minutos, com agitação periódica do mesmo utilizando um pequeno bastão de vidro. O fluxo da coluna foi, então, normalizado e o efluente coletado como descrito previamente. O volume final (36,5 ml) foi chamado de Fração II. O mesmo procedimento básico foi utilizado para obter-se as demais frações: Fração III (volume=40ml), obtida com tampão de equilíbrio contendo 0,5M de NaCl; Fração IV (volume=18 ml), obtida com tampão de equilíbrio contendo 1M de NaCl. As frações foram concentradas utilizando membranas YM-10, como já descrito. Após determinação das concentrações proteicas, as frações foram aliquotadas e mantidas a -70°C até o momento do uso.

3. Padronização da técnica imunoenzimática (ELISA)

A técnica de ELISA foi desenvolvida utilizando o Sistema F.A.S.T. - ELISA® (Becton-Dickinson and Company, New Jersey, USA). Neste sistema, tampas de placas de microtitulação têm fixadas à sua superfície interna 96 pequenas esferas de poliestireno em uma disposição que permite o encaixe preciso das mesmas nos orifícios de placas de ELISA. Na realização do teste, as esferas revestidas com antígenos são imersas nos orifícios de uma placa de reação contendo as diluições apropriadas dos soros a serem testados. Após o período de incubação, as esferas são lavadas e a tampa é transferida para uma placa de reação contendo o conjugado. Após a incubação com o conjugado e lavagem das esferas, a tampa é transferida para uma placa de reação contendo o sistema substrato. Após nova incubação, a tampa com as esferas é removida da placa e desprezada, sendo as absorvâncias das reações na placa contendo o sistema substrato determinadas utilizando uma leitora de placas de ELISA. A técnica de ELISA foi padronizada de acordo com o protocolo idealizado por Hancock e Tsang (1986) para a pesquisa de anticorpos anti - *Schistosoma mansoni*, com algumas modificações. As incubações com os soros, conjugado e sistema substrato (5 minutos cada), foram realizadas com agitação contínua das placas de reação utilizando um agitador Kline com movimentos orbitais (Fanem LTDA, São Paulo, Brasil). As lavagens das esferas foram efetuadas primeiro com SST contendo 0,1 % de Tween 20 (SST-Tw) e depois com SST. As lavagens com SST-Tw foram feitas com o auxílio de um "sprayer" de ar comprimido portátil (Ames Company, Parkersburg, USA). As lavagens com SST foram realizadas com um jato de tampão fluindo através de uma mangueira de látex utilizando um sistema de sifonação.

3.1. Preparação dos soros padrões

Três "pools" distintos de soros humanos, um de pacientes com Doença de Chagas (PCH), um de pacientes com leishmaniose (PLH) e um de pessoas saudáveis (PSN),

foram utilizados para testar os extratos brutos de *T.cruzi* e as frações obtidas pelas cromatografias de afinidade e troca iônica.

O PCH foi preparado misturando-se partes iguais de soros de 10 pacientes chagásicos crônicos. Todos os pacientes apresentavam, além de epidemiologia e quadro clínico compatível com Doença de Chagas, níveis significativos de anticorpos anti-*T.cruzi*, detectados por IFI. O PLH foi preparado misturando-se partes iguais de soros de quatro pacientes infectados com *Leishmania tropica* e de dois pacientes infectados com *Leishmania donovani*. O PSN foi preparado misturando-se partes iguais de soros de quinze pessoas sadias, funcionários e estudantes da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todas as pessoas sadias apresentavam epidemiologia e reações sorológicas para Doença de Chagas negativas.

Ao PCH foi atribuído, arbitrariamente, uma concentração de anticorpos anti-*T.cruzi* equivalente a 1000 unidades de atividade por ml (U/ml). Soros padrões positivos para Doença de Chagas, com atividades variando de 5 a 800 U/ml, foram preparados diluindo-se o PCH com o PSN.

3.2. Determinação das concentrações ótimas dos reagentes

3.2.1. Determinação da concentração ótima do antígeno

As preparações antigênicas de *T. cruzi* (extratos brutos e frações) foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,05 M pH = 8,0, contendo 0,3 M de KCl e 2 mM de EDTA, de modo a se obter concentrações de proteína variando de 0,01 a 6 µg/ml. Foram adicionados aos orifícios de uma placa de ELISA de fundo chato, em triplicata, 170 µl de cada diluição do antígeno. As esferas de poliestireno foram imersas nos orifícios contendo as várias diluições do antígeno e as placas foram mantidas, à temperatura ambiente, por 90 minutos, com agitação contínua, sendo, a seguir, deixadas a 4°C, por 15 horas, em repouso. Após a sensibilização, as esferas foram lavadas com SST-Tw e SST, como previamente

descrito. A tampa com as esferas sensibilizadas foi transferida para uma placa de ELISA de fundo chato contendo em seus orifícios 100 µl de PCH diluído a 1/30 com SST-Tw. Após incubação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação contínua, as esferas foram lavadas, como já descrito. A tampa foi, então, transferida para uma placa contendo 19 ml do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase) diluído a 1:500 em SST-Tw. Após incubação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação contínua, as esferas foram lavadas, como já descrito, e transferidas para uma placa de ELISA de fundo chato contendo 150 µl do sistema substrato, tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por orifício. Após incubação, sob as mesmas condições, a tampa com as esferas foi retirada e desprezada. As absorbâncias das reações foram lidas a 630 nm, em uma leitora de placas de ELISA (Eti-System Reader, Sorin Biomedica, Itália).

3.2.2. Determinação da concentração ótima do conjugado

Para a determinação da concentração ótima do conjugado, as esferas de poliestireno foram sensibilizadas com EB-SST, contendo 3 µg de proteína/ml, diluído em tampão Tris - HCl 0,05 M pH = 8,0, contendo 0,3 M de KCl e 2 mM de EDTA. Aos orifícios de uma placa de poliestireno de fundo chato foram adicionados 100 µl de PCH diluído a 1/30 com SST - Tw. Após incubação com o soro, por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação contínua, as esferas foram lavadas, como já descrito, e transferidas para uma placa de poliestireno de fundo chato contendo, em triplicata, 100 µl de várias diluições (1/250; 1/500; 1/750; 1/1000; 1/2000; 1/4000; 1/10000; 1/20000) do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase) em SST - Tw. Após incubação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, e lavagem das esferas, foi feita a incubação, nas mesmas condições, com o sistema substrato (TMB/ H_2O_2). Após a incubação com o sistema substrato, as absorbâncias das reações foram lidas a 630 nm, como já descrito.

3.2.3. Determinação da concentração ótima do sistema substrato

A concentração dos reagentes do sistema substrato usada neste estudo foi baseada no trabalho de Hancock e Tsang (1986). A solução final continha 0,42 mM de TMB e 1,42 mM de H_2O_2 em tampão acetato de sódio-ácido acético glacial 0,1 M pH = 5,5. A solução foi preparada, sempre, 5 minutos antes do uso.

3.3. Técnica imunoenzimática padronizada.

Aos orifícios de placas de ELISA de fundo chato, foram adicionados 170 μ l da preparação antigênica de *T. cruzi* (extrato bruto ou frações), com 3 μ g de proteína/ml, diluída em tampão Tris HCl 0,05 M, contendo 0,3 M de KCl e 2 mM de EDTA, pH = 8,0. As esferas de poliestireno permaneceram imersas nesta solução por 90 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, e por 15 horas, a 4°C, em repouso. Após lavagem com SST-Tw e com SST, as esferas foram transferidas para uma placa de poliestireno de fundo chato contendo em seus orifícios 100 μ l dos soros diluídos a 1/30 em SST - Tw. Após incubação por 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, as esferas foram lavadas, como previamente descrito, e transferidas para uma placa contendo 19 μ l do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase) diluído a 1/500 com SST - Tw. Após nova incubação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, seguida por lavagem das esferas, as mesmas foram transferidas para uma placa de poliestireno de fundo chato, contendo em seus orifícios 150 μ l do sistema substrato (TMB/ H_2O_2). Após incubação por 5 minutos, à temperatura ambiente, com agitação contínua, a tampa com as esferas foi desprezada e as absorbâncias das reações foram lidas a 630 nm, em uma leitora de placas de ELISA. Em cada placa de reação, foram incluídos vários soros padrões positivos para Doença de Chagas contendo 5 a 1000 U/ml. Cada soro foi testado em triplicata e a média das absorbâncias obtidas foi transformada em U/ml utilizando a curva padrão gerada pelos resultados obtidos com os soros padrões. O “cut-off” da técnica foi determinado utilizando-se o índice J (YOU DEN, 1950).

3.4. Variação intra-ensaio

Para determinar a variação intra-ensaio, um soro padrão positivo para Doença de Chagas, com 200 U/ml, foi diluído a 1/30, como já descrito, e, então, dispensado em 54 orifícios de uma placa de poliestireno de fundo chato. Cada orifício recebeu 100 µl do soro padrão diluído, utilizando uma micropipeta automática de precisão. Os demais passos da reação foram realizados, como já descrito. O coeficiente médio de variação intra-ensaio foi determinado utilizando-se as absorbâncias obtidas.

3.5. Variação inter-ensaio

A variação inter-ensaio foi determinada pelos resultados obtidos com 8 análises, em triplicata, de um soro padrão para Doença de Chagas, contendo 200 U/ml, realizadas em um período de 60 dias. As condições de realização da técnica, já foram descritas nos itens anteriores.

4. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Bradford (1976), utilizando um " kit " comercial (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

5. Reação de fixação de complemento (RFC)

As RFC foram realizadas de acordo com a técnica descrita por Kolmer, Spaulding e Robinson (1951), com algumas modificações. A suspensão de hemácias de carneiro foi padronizada de modo que uma diluição da mesma a 1:10 em água destilada fornecesse uma absorbância igual a $0,5 \pm 0,01$, a 545 nm. Os soros foram previamente inativados por 30 minutos, a 56°C, e a seguir foram feitas várias diluições de cada amostra

em solução salina tamponada com barbital (SSTB). Em tubos de ensaio, foram misturados 200 µl de cada uma das diluições dos soros e 100 µl de antígeno metílico para Chagas, previamente titulado e diluído em SSTB. Após incubação, por 20 minutos, à temperatura ambiente, acrescentou-se aos tubos, 200 µl de soro de cobaia (fonte de complemento), previamente titulado e diluído em SSTB. Após incubação, por 60 minutos, a 37°C, adicionou-se aos tubos 200 µl do sistema hemolítico (suspensão de hemácias e solução de hemolisina previamente titulada, misturadas volume a volume). Após incubação, por 30 minutos, a 37°C, com agitação periódica, a leitura das reações foi feita visualmente.

6. Reação de imunofluorescência indireta (IFI)

As reações de IFI foram realizadas como previamente descrito por Camargo (1966) e Camargo e Souza (1966), com algumas modificações. Em círculos delimitados em lâminas de microscopia contendo formas epimastigotas de *T. cruzi* fixadas, foram aplicados 10 µl de várias diluições de cada soro em SST. Após incubação, por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°C, as lâminas foram lavadas 3 vezes, através de imersão, em cubas de vidro contendo SST, durante 5 minutos por lavagem. Após secagem das lâminas, foram aplicados, à cada diluição do soro, 10 µl do conjugado (anti - IgG humana marcada com fluoresceína), previamente titulado e diluído em SST contendo 0,001 % de azul de Evans. As lâminas foram deixadas, em câmara úmida, a 37°C, durante 30 minutos, e, a seguir, lavadas, como já descrito. Após a montagem das lâminas com o auxílio de glicerina tamponada e laminula, as reações foram lidas em microscópio de fluorescência (microscópio Olympus CBA, Japão).

CASUÍSTICA

I . Pacientes com Doença de Chagas

Foram obtidas amostras de soros de 50 pacientes, com epidemiologia positiva para a Doença de Chagas, de ambos os sexos, com idades variando de 22 a 81 anos, com a seguinte distribuição:

- 37 pacientes com sintomatologia compatível com as formas crônicas (cardíaca e/ou digestiva) da doença - pacientes 1 a 37.
- 13 pacientes assintomáticos ou com sintomas inespecíficos - pacientes 38 a 50.

Todos os pacientes foram atendidos nos ambulatórios do Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC / UNICAMP).

II . Soros de pacientes com infecções heterólogas

Foram obtidas amostras de soros de 58 pacientes com infecções heterólogas, residentes em áreas não endêmicas para Doença de Chagas. A quantidade de amostras de soros de cada infecção bem como a procedência das mesmas, são descritas a seguir:

Infecção	n	Procedência		
		A	B	C
Hepatite A	5	2	3	—
Hepatite B	6	3	3	—
Hepatite C	5	2	3	—
D. Inclusão Citomegálica	3	—	3	—
Mononucleose	3	—	3	—
Toxoplasmose	6	3	3	—
Sífilis	6	6	—	—
Esquistossomose (<i>S. mansoni</i>)	5	5	—	—
Esquistossomose (<i>S. haematobium</i>)	5	5	—	—
Leishmaniose (<i>L. donovani</i>)	8	8	—	—
Leishmaniose (<i>L. tropica</i>)	6	1	—	5

n = número de amostras; A = Amostras cedidas pelo Dr. Victor C.W.Tsang - Laboratório de Imunologia do Centro para Controle de Doenças Infecciosas (CDC), Atlanta, E.U.A.; B = Amostras cedidas pelo Dr. Steve Roach - Serviço de Virologia do Laboratório de Patologia Clínica da Universidade de Liverpool, Inglaterra; C = Amostras cedidas pela Dra. Marilena Gomes Paes - Núcleo de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de Manaus, Brasil.

III. Soros de pessoas sadias

Foram obtidas 20 amostras de soros de pessoas sadias, funcionários e estudantes da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Todas as pessoas apresentavam epidemiologia negativa para a Doença de Chagas.



4. Resultados

ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti - *T. cruzi*

1. Determinação das concentrações ótimas dos reagentes

1.1. Determinação da concentração ótima de antígeno

Estudos preliminares indicaram que a fração II do EB-SST fornecia os melhores resultados para a pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi*. Para a determinação das concentrações ótimas das preparações antigênicas para a técnica de ELISA, concentrações variáveis do EB-SST e da fração II foram testadas, e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 1 e 2.

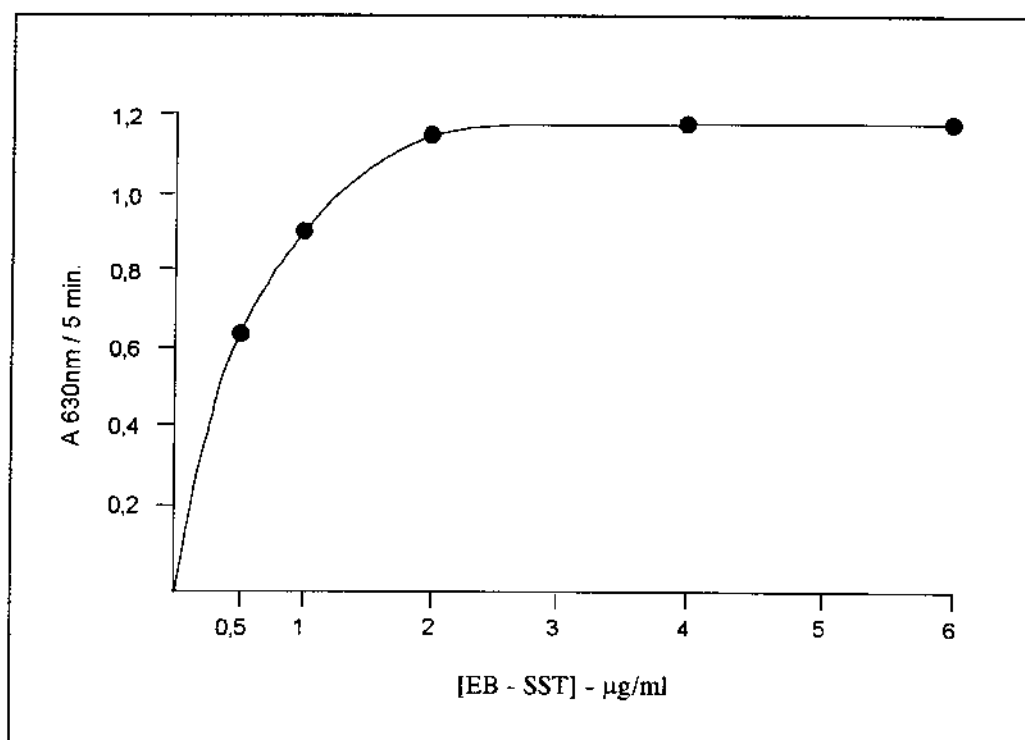


Figura 1. Titulação do extrato bruto de *T.cruzi* (EB-SST) por ELISA. As esferas de poliestireno foram revestidas com diferentes concentrações do EB-SST. O conjugado foi diluído a 1:500 em PBS - Tw. TMB / H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm.

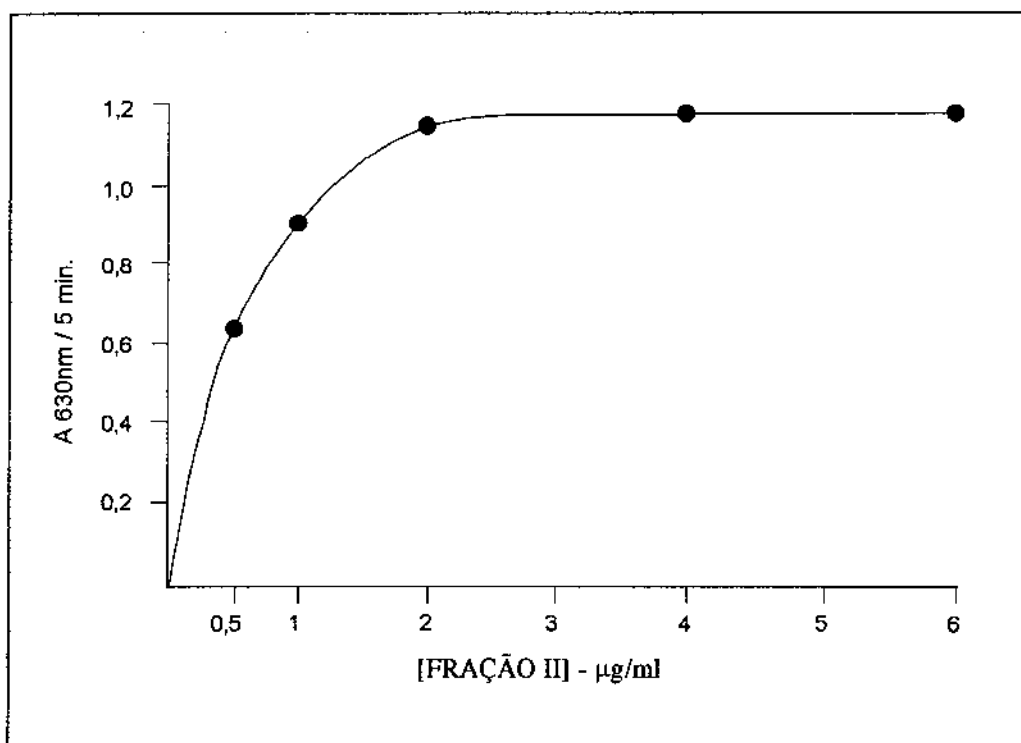


Figura 2. Titulação da fração II do EB-SST purificada por cromatografia de troca iônica. As esferas de poliestireno foram revestidas com diferentes concentrações da fração II. O conjugado foi diluído a 1:500 em PBS-Tw. TMB/H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm.

Como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, tanto com o EB-SST como com a fração II, a partir de 2 µg de proteína/ml não houve aumento das D.O das reações. Para a técnica de ELISA, as esferas foram revestidas com preparações antigênicas contendo uma concentração de 3 µg de proteína/ml.

1.2. Determinação da concentração ótima do conjugado

Para a determinação da concentração ótima do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase), diferentes concentrações do mesmo foram testadas e os resultados estão representados na Figura 3.

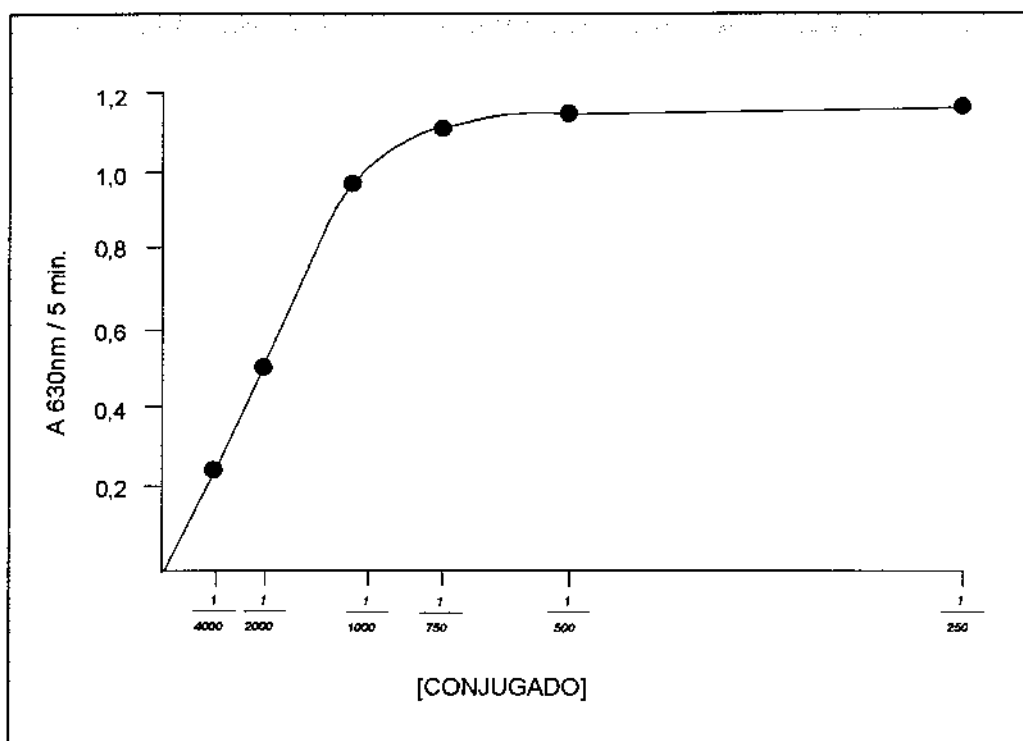


Figura 3. Titulação do conjugado (anti-IgG humana marcada com peroxidase). As esferas de poliestireno foram revestidas com EB-SST contendo 3 µg de proteína/ml. Diferentes diluições do conjugado foram testadas. TMB / H₂O₂ foi utilizado como substrato. A intensidade de conversão do substrato foi medida a 630 nm.

Como pode ser observado, diluições do conjugado superiores a 1:500 resultaram em diminuição das D.O das reações. Para a técnica de ELISA, utilizou-se o conjugado diluído a 1:500 em SST - Tw.

2. Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB - SST e frações obtidas por meio de cromatografias em colunas de Sepharose 4B - lentil-lectina e DEAE - Sephacel

O fracionamento do EB-SST por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B - lentil-lectina resultou em duas frações, uma sem afinidade por lentil-lectina (fração A) e outra com afinidade (fração B). O fracionamento do EB-SST por

cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel resultou em quatro frações eluídas com concentrações salinas crescentes (frações I a IV). As atividades antigênicas específicas e as reatividades cruzadas do EB-SST e das frações obtidas por cromatografias de afinidade e troca iônica foram avaliadas utilizando a técnica de ELISA padronizada e um pool de soros de pacientes chagásicos (PCH), um pool de soros de pacientes com leishmaniose (PLH) e um pool de soros de pessoas sadias (PSN). Os resultados obtidos com o EB-SST e com as frações resultantes das cromatografias de afinidade e troca iônica são mostrados, respectivamente, nos Quadros I e II.

Quadro I. Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB-SST e frações obtidas por cromatografia em Sepharose 4B lentil-lectina.

MATERIAL	Absorbância (630nm)			Relação entre Absorbâncias	
	PCH	PLH	PSN	PCH/PLH	PCH/PSN
EB-SST	1,21	0,51	0,07	2,37	17,29
FRAÇÃO A	1,17	0,50	0,09	2,34	13,00
FRAÇÃO B	1,18	0,37	0,10	3,19	11,80

PCH = pool de soros de pacientes com Doença de Chagas; PLH = pool de soros de pacientes com leishmaniose; PSN = pool de soros de pessoas sadias.

Quadro II. Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB-SST e frações obtidas por cromatografia em DEAE-Sephacel.

Material	Absorbância (630 nm)			Relação entre Absorbâncias	
	PCH	PLH	PSN	PCH/PLH	PCH/PSN
EB-SST	1,25	0,48	0,07	2,60	17,85
Fração I	1,18	0,39	0,33	3,03	3,58
Fração II	1,13	0,12	0,07	9,42	16,14
Fração III	1,39	0,39	0,24	3,56	5,79
Fração IV	0,38	0,10	0,44	3,80	0,86

PCH = pool de soros de pacientes com Doença de Chagas; PLH = pool de soros de pacientes com leishmaniose; PSN = pool de soros de pessoas sadias.

Como pode ser observado no Quadro I, o EB-SST e a fração sem afinidade por lentil-lectina (fração A) exibiram relações entre absorbâncias PCH/PLH, praticamente, idênticas. A fração com afinidade por lentil-lectina (fração B) apresentou relação entre as absorbâncias PCH/PLH um pouco maior do que aquelas obtidas com o EB-SST e a fração A, resultante de uma menor reatividade cruzada com o PLH. Por outro lado, o Quadro II mostra que a reatividade cruzada com leishmaniose diminuiu significativamente com as frações II e IV, obtidas pela cromatografia de troca iônica do EB-SST em DEAE-Sephacel. A fração II, devido a maior reatividade com PCH e menor reatividade com PSN, foi escolhida como antígeno para a técnica de ELISA.

3. Resultados da pesquisa de anticorpos anti - *T.cruzi*

Os resultados da pesquisa de IgG anti-*T.cruzi* com a técnica de ELISA nos soros de pacientes chagásicos, pacientes com infecções heterólogas e pessoas sadias são mostrados na Figura 4. O Quadro III mostra os resultados da pesquisa de anticorpos anti - *T.cruzi* com as técnicas de ELISA, IFI e RFC nos pacientes com Doença de Chagas. Os Quadros IV e V mostram, respectivamente, os resultados da pesquisa de anticorpos anti - *T.cruzi* com as técnicas de ELISA e IFI nos pacientes com infecções heterólogas e nas pessoas sadias.

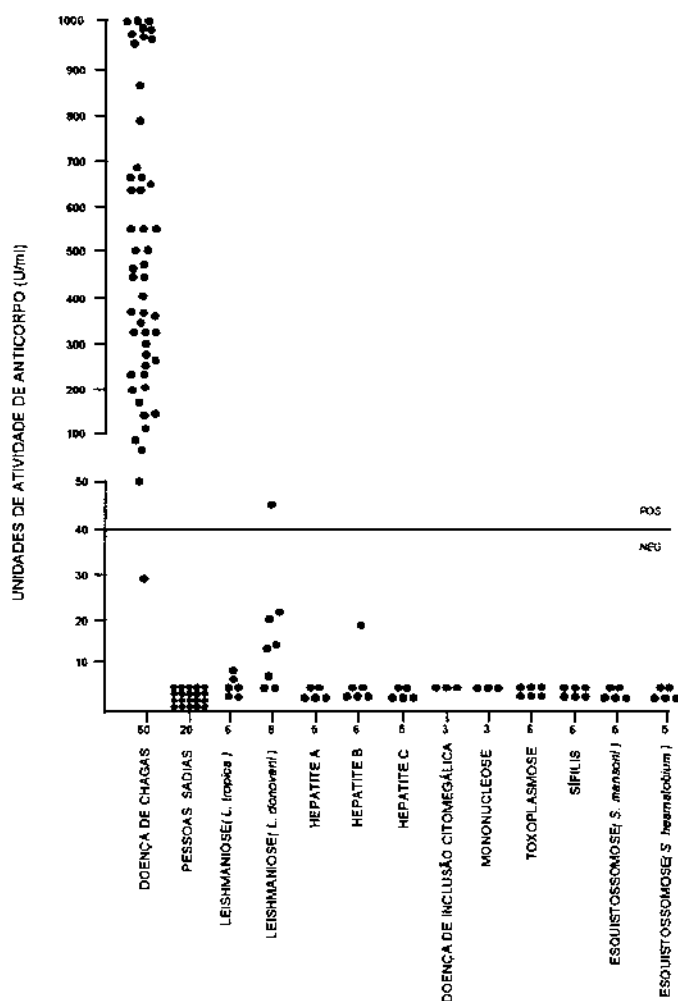


Figura 4. Resultados da pesquisa de IgG anti - *T.cruzi* por ELISA em 50 pacientes com Doença de Chagas, 58 pacientes com infecções heterólogas e 20 pessoas sadias

Quadro III. Pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* em pacientes com Doença de Chagas.

Pacientes	Reações sorológicas		
	ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)	RFC (Título de Ac)
1	240	80	ND
2	255	160	2
3	1000	160	4
4	640	640	64
5	1000	160	8
6	340	160	8
7	290	80	ND
8	202	160	8
9	1000	320	16
10	150	160	16
11	370	320	64
12	795	320	64
13	1000	80	8
14	400	640	32
15	460	160	16
16	1000	640	64
17	475	320	ND
18	260	40	2
19	1000	320	32
20	765	1280	128
21	310	160	ND
22	305	320	8
23	550	640	32
24	610	320	32

Quadro III (cont). Pesquisa de anticorpos anti - *T.cruzi* em pacientes com Doença de Chagas.

Pacientes	Reações sorológicas		
	ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)	RFC (Título de Ac)
25	625	320	16
26	350	160	64
27	550	80	32
28	320	80	ND
29	450	160	ND
30	630	80	ND
31	315	80	4
32	155	40	2
33	127	40	NR
34	96	20	NR
35	85	20	NR
36	50	<20	NR
37	29	<20	NR
38	370	40	8
39	975	80	4
40	375	640	8
41	490	1280	32
42	685	640	8
43	190	40	2
44	250	160	8
45	1000	640	ND
46	500	160	ND
47	550	160	ND
48	170	40	ND
49	225	320	ND
50	1000	640	ND

Ac = anticorpo; ND = não determinado; NR = não reagente

Quadro IV. Pesquisa de anticorpos anti *T.cruzi* em pacientes com infecções heterólogas.

Infecção	Pacientes	Reações sorológicas	
		ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)
HEPATITE A	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20
HEPATITE B	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	8	< 20
	6	20	< 20
HEPATITE C	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20
DOENÇA DE INCLUSÃO CITOMEGÁLICA	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20

Quadro IV (cont). Pesquisa de anticorpos anti *T.cruzi* em pacientes com infecções heterólogas.

Infecção	Pacientes	Reações sorológicas	
		ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)
MONONUCLEOSE	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
TOXOPLASMOSE	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20
	6	< 5	< 20
SÍFILIS	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20
	6	< 5	< 20
ESQUISTOSSOMOSE (<i>S. mansoni</i>)	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20

Quadro IV (cont.). Pesquisa de anticorpos anti *T.cruzi* em pacientes com infecções heterólogas.

Infecção	Pacientes	Reações sorológicas	
		ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)
ESQUISTOSSOMOSE (<i>S. haematobium</i>)	1	< 5	< 20
	2	< 5	< 20
	3	< 5	< 20
	4	< 5	< 20
	5	< 5	< 20
LEISHMANIOSE (<i>L.donovani</i>)	1*	< 5	<20
	2*	5	20
	3*	< 5	<20
	4*	45	40
	5*	20	40
	6*	16	20
	7*	22	40
	8*	15	20
LEISHMANIOSE (<i>L.tropica</i>)	1**	10	20
	2**	< 5	<20
	3**	< 5	<20
	4**	< 5	<20
	5**	< 5	<20
	6*	< 5	20

* Amostras de soros cedidas pelo Dr. Victor Tsang (CDC, Atlanta, EUA);

** Amostras de soros cedidas pela Dra. Marilena Paes (IMT, Manaus, Brasil)

Quadro V. Pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* em pessoas sadias.

n	Reações sorológicas		n	Reações sorológicas	
	ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)		ELISA-IgG (U/ml)	IFI-IgG (Título de Ac)
1	< 5	< 20	11	< 5	< 20
2	< 5	< 20	12	< 5	< 20
3	< 5	< 20	13	< 5	< 20
4	< 5	< 20	14	< 5	< 20
5	< 5	< 20	15	< 5	< 20
6	< 5	< 20	16	< 5	< 20
7	< 5	< 20	17	< 5	< 20
8	< 5	< 20	18	< 5	< 20
9	< 5	< 20	19	< 5	< 20
10	< 5	< 20	20	< 5	< 20

n = Pessoas sadias; Ac = anticorpo.

Os soros dos pacientes com Doença de Chagas exibiram níveis de anticorpos por ELISA variando de 29 a 1 000 U/ml. O "cut-off" da reação foi calculado com base no índice J através da seguinte fórmula: índice J = $(a/b) + (c/d) - 1$; onde a = número de pacientes com Doença de Chagas apresentando sorologia positiva, b = número total de pacientes com infecção chagásica incluídos no estudo, c = número de pessoas não infectadas com *T. cruzi* apresentando sorologia negativa e d = número total de pessoas não infectadas com *T. cruzi* incluídas no estudo. O índice J foi calculado para valores de "cut-off" variando de 20 a 50 U/ml, de 10 em 10 unidades. O maior índice J obtido foi 0,967, correspondente a um valor de "cut-off" de 40 U/ml. Utilizando este valor, a sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA desenvolvida foram, respectivamente, 98 e 98,72%.

Na técnica de IFI, considerando títulos de anticorpos IgG ≥ 40 como significativos, a sensibilidade e a especificidade do teste foram, respectivamente, 92% e 96,15%. A RFC foi realizada somente em 37 dos 50 soros de pacientes com Doença de Chagas incluídos no estudo. A reação foi positiva em 32 (86,49 %) dos soros testados.

4. Variação intra e inter - ensaio

As variações intra e inter-ensaio da técnica ELISA foram, respectivamente, 3,65 e 6,95 %.

5. Rendimento das frações obtidas pela cromatografia de troca iônica do EB-SST em DEAE-Sephacel.

A cromatografia de troca iônica do EB-SST em DEAE-Sephacel resultou em quatro frações (I, II, III e IV), sendo que a fração II, eluída com tampão Tris-HCl 0,02M, pH= 8.1, contendo 0,25M de NaCl, foi utilizada para o desenvolvimento da técnica de ELISA. No Quadro VI, é apresentado o rendimento (média de dois experimentos), em termos de quantidade de material obtido, das quatro frações resultantes da cromatografia de troca iônica.

Quadro VI. Rendimento das frações obtidas por cromatografia do EB-SST em DEAE-Sephacel.

MATERIAL	RENDIMENTO (mg)	% EM RELAÇÃO AO EB-SST
EB-SST	16.25	-
FRAÇÃO I	2.98	18.34
FRAÇÃO II	9.65	59.38
FRAÇÃO III	1.04	6.40
FRAÇÃO IV	1.10	6.77

6. Atividade antigênica específica e reatividade cruzada do EB-SST e do EB-U.

As atividades antigênicas específicas e reatividades cruzadas do EB-SST e EB-U foram avaliadas utilizando os três “pools” de soros humanos, PCH, PLH e PSN. Não foram encontradas diferenças significativas, em termos de atividade antigênica específica e reatividade cruzada, entre os dois extratos brutos.



5. Discussão

A maioria das pessoas imunocompetentes com Doença de Chagas é assintomática ou exibe sinais e sintomas não patognomônicos da infecção. Os pacientes com Doença de Chagas crônica podem apresentar anormalidades cardíacas e/ou digestivas severas, mas estas manifestações clínicas são, usualmente, precedidas por muitos anos de infecção assintomática. Deste modo, a suspeita clínica da infecção, além de precisar levar em consideração aspectos epidemiológicos, deve ser confirmada por métodos laboratoriais (RASSI et al., 1992).

Com relação ao diagnóstico laboratorial da fase crônica da infecção chagásica, uma série de trabalhos tem mostrado que os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico, inoculação de camundongos e cultura do parasita) são positivos em, no máximo, 50% dos casos (CHIARI, 1992). A comprovação da infecção crônica por meio da pesquisa de antígenos solúveis do *T. cruzi*, no sangue ou na urina, tem sido objeto de investigação por muitos anos (FERREIRA, 1992). Vários estudos têm mostrado que a pesquisa de antígenos de *T. cruzi* é positiva em, aproximadamente, 50% dos pacientes com infecção crônica (ARAUJO, CHIARI & DIAS, 1981; TANOWITZ et al., 1992), gerando dúvidas a respeito de sua utilidade para o diagnóstico da Doença de Chagas (TANOWITZ et al., 1992). Entretanto, é inquestionável que tanto a pesquisa de antígenos de *T. cruzi* no sangue ou em outros fluídos do corpo como a pesquisa do próprio parasita podem ser decisivas para a confirmação da suspeita clínica da Doença de Chagas em pacientes com epidemiologia e/ou manifestações clínicas compatíveis com a infecção apresentando sorologia negativa ou duvidosa, particularmente em pacientes com comprometimento do sistema imune ou submetidos à terapia imunossupressora (KOHL et al., 1982; LEIGUARDA et al., 1990).

A detecção de sequências de DNA de microorganismos utilizando amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das mais promissoras possibilidades para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias, incluindo a Doença de Chagas. A técnica de PCR, além de produzir resultados mais rápidos do que aqueles obtidos com as técnicas de isolamento dos agentes infecciosos e de apresentar maior sensibilidade em relação aos procedimentos empregados para a detecção de antígenos dos parasitas, não é

afetada por disfunções da resposta imune do hospedeiro. Alguns estudos têm comprovado a alta sensibilidade da técnica de PCR para o diagnóstico da Doença de Chagas. A técnica, por exemplo, é capaz de detectar 0.05% a 0.1% do material gênico de um único parasita (TANOWITZ et al., 1992). Ávila et al. (1993), utilizando “primers” de DNA de cinetoplasto (DNAC) de *T.cruzi* mostraram que a técnica de PCR foi positiva em 99% dos pacientes chagásicos crônicos estudados. Wincker et al. (1994), utilizando “primers” de DNAC de *T.cruzi*, encontraram reações de PCR positivas em 97% dos pacientes chagásicos crônicos com sorologia positiva para Doença de Chagas incluídos em seu estudo. Em 4 dos 6 pacientes com sorologia duvidosa, o diagnóstico da infecção chagásica foi confirmado por PCR.

Deve ser lembrado que a parasitemia intermitente observada em pacientes chagásicos crônicos pode gerar resultados de PCR falso-negativos. Por outro lado, teoricamente, resultados falso-positivos podem não ser raros, devido a grande similaridade gênica observada entre o *T.cruzi* e espécies relacionadas. Resultados falso-positivos devido à contaminação das amostras sendo testadas com produtos de amplificação gênica gerados em ensaios prévios, podem, também, ser encontrados. Em suma, a decisão com respeito a utilidade da técnica de PCR para o diagnóstico da Doença de Chagas depende, ainda, de muitos estudos, principalmente de avaliações decorrentes de estudos epidemiológicos e de ensaios realizados com rotinas bem definidas como as de bancos de sangue.

Até o presente momento, os métodos laboratoriais baseados na pesquisa de anticorpos específicos têm sido os mais utilizados para a identificação ou confirmação da infecção crônica por *T.cruzi*. De um modo geral, na maioria das pessoas imunocompetentes infectadas com o parasita e não tratadas, é possível detectar anticorpos específicos das classes IgM e IgG após as primeiras manifestações clínicas da fase aguda da infecção. No curso da infecção crônica, os anticorpos específicos da classe IgG são regularmente encontrados no sangue em níveis variáveis que não apresentam relação com a gravidade da doença (CAMARGO, 1992).

A constituição molecular do *T.cruzi* é muito complexa. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida de extratos brutos do parasita revela centenas de componentes (DRAGON et al., 1985). Vários estudos têm mostrado que antígenos de *T.cruzi* podem ser reconhecidos por anticorpos presentes em outras doenças infecciosas e parasitárias, incluindo leishmaniose (AFCHAIN et al., 1979; ARAUJO, 1992; CAMARGO, 1992; FERREIRA, 1992; STOLF, 1992); infecções causadas por outras espécies de *Trypanosoma* (SEAH & MARSDEN, 1970; AFCHAIN et al., 1979; CAMARGO, 1992; SALDAÑA & SOUZA, 1996), esquistossomose mansônica (ALMEIDA et al., 1990; ARAUJO, 1992), malária (ALMEIDA et al., 1990), toxoplasmose (HOSHINO-SHIMIZU, CAMARGO & UMEZAWA, 1975), sífilis (ALMEIDA et al., 1990) e hepatite B (KRIEGER et al., 1992). Sem dúvida, um dos maiores desafios com relação à sorologia para a Doença de Chagas é a expressão no *T.cruzi* de componentes antigênicos reconhecidos por anticorpos induzidos contra outros agentes infecciosos. Particularmente importante é a reatividade cruzada observada entre Doença de Chagas e leishmaniose, visto que em grandes áreas geográficas as duas parasitoses se sobrepõem (STOLF, 1992). Estudos comparativos realizados com extratos solúveis de parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, empregando soros de coelhos hiperimunes e as técnicas de imunodifusão dupla em gel e imunoeletroforese, mostraram que, aproximadamente, 30% dos antígenos de *T.cruzi* são encontrados tanto em *L.donovani* como em *L.mexicana* (AFCHAIN et al., 1979).

O desenvolvimento de tecnologia para a pesquisa de antígenos e anticorpos específicos, além de contribuir para o conhecimento da interação parasita-hospedeiro, é essencial para o imunodiagnóstico das doenças e, conseqüentemente, para o estudo epidemiológico das mesmas.

A técnica ELISA vem sendo cada vez mais utilizada para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas. Como ocorre com qualquer técnica imunológica, a sensibilidade e a especificidade da técnica ELISA dependem, em grande parte, da preparação antigênica utilizada. A utilização de extratos brutos de *T.cruzi* em técnicas imunoenzimáticas de alta sensibilidade pode gerar resultados falso-positivos decorrentes da reatividade cruzada com

antígenos de outros parasitas (ARAUJO, 1992). Deste modo, o fracionamento de extratos brutos do parasita, na tentativa de se encontrar frações com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada, é um passo importante para o desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas com alta sensibilidade e especificidade.

A lentil-lectina é uma hemaglutinina, com peso molecular de 49 000 daltons (Da), isolada da lentilha (*Lens culinaris*), com afinidade para os resíduos terminais de carboidratos α - D-manosil e α - D-glucosil (HOWARD et al., 1971; CLARKE & HOGGART, 1982). Glicoproteínas de parasitas com potencial para o imunodiagnóstico das infecções têm sido purificadas de parasitas por meio de cromatografias de afinidade com Sepharose 4B - lentil-lectina (SNARY & HUDSON, 1979; SCHECHTER et al., 1983; TSANG, BRAND & BOYER, 1989). Snary e Hudson, em 1979, utilizando cromatografia de afinidade com Sepharose 4B-lentil-lectina, purificaram de formas epimastigotas de *T.cruzi* solubilizadas com detergente uma proteína com peso molecular de 90 000 daltons (GP90). Schechter et al. (1983, 1985), utilizando GP 90 como antígeno, desenvolveram uma técnica imunoenzimática que apresentou em dois estudos subsequentes sensibilidade superior a 96% e especificidade próxima a 100%. Entretanto, a técnica não teve bom desempenho quando avaliada em um estudo comparativo com outras técnicas utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi*, apresentando sensibilidade de 21% e especificidade de 62% (MONCAYO & LUQUETTI, 1990; CAMARGO, 1992). A baixa especificidade encontrada no estudo comparativo foi, em grande parte, devida à reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose.

No nosso trabalho, formas epimastigotas de *T.cruzi* foram desintegradas por sonicação e os antígenos foram extraídos com solução salina tamponada com fosfatos por meio de agitação lenta e contínua durante 15 horas. Com o intuito de se encontrar frações com alta atividade antigênica específica e baixa reatividade cruzada, fracionamos o extrato bruto de *T.cruzi* por meio de cromatografias de afinidade em colunas de Sepharose 4B - lentil-lectina e de troca iônica em colunas de DEAE - Sephacel. As frações foram testadas por ELISA, utilizando três "pools" de soros: PCH (pacientes chagásicos), PLH (pacientes com leishmaniose) e PSN (pessoas saudáveis). O PLH foi utilizado devido a grande reatividade

cruzada observada entre o *T.cruzi* e as várias espécies de *Leishmania*. Resultados similares, em termos de atividade antigênica específica e reatividade cruzada, foram encontrados quando o EB-SST e a fração sem afinidade por lentil-lectina (fração A) foram testados por ELISA com PCH e PLH. Em relação ao EB-SST, a fração com afinidade por lentil-lectina (fração B) apresentou, praticamente, a mesma atividade antigênica específica com PCH e uma reatividade cruzada um pouco menor com PLH. O alto grau de reatividade cruzada observado quando a fração B foi testada com PLH confirma, em parte, os resultados de outros estudos que mostram a baixa especificidade de técnicas imunoenzimáticas que utilizam como antígeno proteínas de *T.cruzi* com afinidade por lentil-lectina (MONCAYO & LUQUETTI, 1990).

O fracionamento do EB-SST por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, resultou em frações que apresentaram reatividades cruzadas com PLH menores do que aquela obtida com o EB-SST, particularmente as frações II e IV. A fração II, escolhida como antígeno para a reação de ELISA, apresentou uma relação entre as absorbâncias obtidas com PCH e PLH 3,6 vezes maior do que aquela obtida com o EB-SST.

No presente trabalho, desenvolvemos uma técnica imunoenzimática para a pesquisa de anticorpos IgG anti - *T.cruzi*, utilizando a fração II obtida pelo fracionamento do EB-SST por cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-Sephacel. Considerando como “cut-off” da reação 40 U/ml, como determinado pelo índice J, a sensibilidade e a especificidade da técnica foram, respectivamente, 98% e 99%. Em termos comparativos, a sensibilidade e a especificidade obtidas com a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgG por IFI, considerando como significativos títulos de anticorpos ≥ 40 , foram, respectivamente, 92% e 96%. Considerando as amostras de soros nas quais a RFC foi realizada, a sensibilidade da reação foi de, aproximadamente, 86%.

Dos 50 pacientes com infecção chagásica crônica incluídos em nosso estudo, 49 apresentaram reações de ELISA reagentes, com níveis de anticorpos variando de 50 a 1 000 U/ml. Em três casos, as reações de ELISA detectaram níveis significativos de anticorpos,

enquanto que as reações de IFI e e RFC foram não reagentes (pacientes 34, 35 e 36). Os três pacientes apresentavam epidemiologia positiva para a Doença de Chagas. Com relação as manifestações clínicas, o paciente 34 apresentava cardiomegalia e extra-sístoles ventriculares e os pacientes 35 e 36 cardiomegalia. Os três pacientes tinham reações de IFI positivas para Doença de Chagas, com títulos variando de 40 a 80, em sorologias realizadas pelo Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP (LPC/HC), em época anterior ao nosso estudo. No presente trabalho, as reações de IFI destes pacientes foram repetidas três vezes, sempre com os mesmos resultados.

Níveis de reatividade de anticorpos próximos ao valor do “cut-off” das reações, ocasionando, com o decorrer do tempo, ora resultados positivos ora negativos é um problema inerente ao diagnóstico sorológico das infecções, incluindo a infecção chagásica (STOLF, 1992). Desde 1986, a reação de IFI vêm sendo realizada no LPC/HC sem nenhuma modificação técnica substancial, empregando parasitas e conjugados do mesmo fornecedor. Deste modo, não está excluída a possibilidade das variações observadas nos níveis de anticorpos detectados por IFI nos pacientes 34, 35 e 36 serem devidas a fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro. Em tais circunstâncias, a utilização de técnicas imunológicas com maior sensibilidade, como a técnica de ELISA, pode ser fundamental para a identificação e/ou confirmação laboratorial da suspeita clínica de infecção chagásica. Somente um dos pacientes do grupo de Doença de Chagas, com diagnóstico clínico de megaesôfago chagásico, exibiu níveis de anticorpos anti - *T.cruzi* abaixo do valor do “cut-off” da técnica de ELISA (paciente 37 com ELISA=29 U/ml). Neste paciente, níveis significativos de anticorpos específicos não foram, também, detectados por IFI e RFC. É importante ressaltar que os resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos anti - *T.cruzi* nos pacientes 34, 35, 36 e 37 com a nossa técnica de ELISA foram confirmados por uma técnica imunoenzimática qualitativa comercial - ABBOTT CHAGAS ANTICORPOS EIA (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

Com relação aos pacientes com infecções heterólogas, nossos resultados comprovam a grande reatividade cruzada observada na sorologia para Doença de Chagas com soros de pacientes com leishmaniose, particularmente com a reação de IFI. Dos 8

soros de pacientes com infecção por *L.donovani* testados, 5 apresentaram reações de ELISA e IFI negativas para a Doença de Chagas, 2 apresentaram reações de ELISA negativas com reações de IFI positivas e 1 apresentou as duas reações positivas. Todos os 6 soros de pacientes com infecções causadas por *L.tropica* testados apresentaram níveis não significativos de anticorpos detectados por ELISA e IFI. É importante, ainda, salientar que 5 pacientes com leishmaniose, 3 infectados com *L.donovani* e 2 com *L.tropica*, apresentaram reações de IFI negativas (IFI = 20), mas com títulos muito próximos ao valor do “cut-off” da técnica.

O custo de uma reação sorológica é um dos fatores que deve ser levado em consideração quando se planeja incluir a mesma numa rotina laboratorial. O custo da reação de ELISA para Doença de Chagas desenvolvida no presente trabalho é de, aproximadamente, R\$ 5,50 (US\$ 5.50) para soros testados em triplicata.

A obtenção de quantidades significativas de material antigênico é um fator importante que deve ser levado em consideração nos processos de obtenção de preparações antigênicas. Estudos prévios têm mostrado que após a extração de antígenos de parasitas com solução salina, a fração residual do parasita, que é, normalmente, desprezada, pode apresentar quantidades significativas de material antigênico ativo (TSANG, TAO & MADDISON, 1981; TSANG et al., 1982; ROSSI et al., 1993). Os nossos resultados, obtidos com a comparação do EB-SST e EB-U, mostram que a fração residual da extração salina solubilizada com uréia contém uma quantidade significativa de material antigênico ativo. Levando em consideração o elevado preço de alguns reagentes utilizados na cultura do *T.cruzi* e o longo período de tempo necessário para a obtenção de quantidades adequadas de parasitas, a possibilidade de aproveitamento da fração residual da extração de antígenos com SST poderá resultar num maior rendimento da preparação antigênica, com a consequente diminuição do custo final da reação.

O desenvolvimento de técnicas de clonagem de DNA e de expressão gênica em bactérias tem permitido a identificação, a caracterização e a produção em larga escala de proteínas de parasitas. Na última década, muitos genes codificando proteínas de *T.cruzi*

reconhecidas por soros de pacientes chagásicos ou de animais infectados com o parasita têm sido clonados e totalmente ou parcialmente sequenciados (IBANEZ et al., 1988; LAFAILLE et al., 1989; LEVIN et al., 1989; COTRIM et al., 1990; FRASCH & REYES, 1990; ZINGALES et al., 1990; FRASCH et al., 1991; FRANCO DA SILVEIRA, 1992; COTRIM et al., 1995). Uma série de estudos tem mostrado que vários antígenos recombinantes de *T. cruzi* apresentam grande potencial para o imunodiagnóstico da infecção chagásica crônica. Entre os antígenos recombinantes de maior potencial, destacam-se: a) **CRA** (“cytoplasmic repetitive antigen”), uma proteína de 225 kDa, expressa em quantidades muito maiores nas formas epimastigotas do que nas tripomastigotas, localizada no corpo do parasita na região de intersecção com o flagelo (IBANEZ et al., 1988; LAFAILLE et al., 1989); b) **FRA** (“flagellar repetitive antigen”), uma proteína de, aproximadamente, 300 kDa expressa nas formas epimastigotas e tripomastigotas, localizada na região do flagelo em contato com o corpo do parasita (IBANEZ et al., 1988; LAFAILLE et al., 1989); c) **B13**, uma proteína de, aproximadamente, 85 kDa expressa preferencialmente nas formas tripomastigotas do parasita (IBANEZ et al., 1988; ZINGALES et al., 1990); d) **H49**, uma proteína de, aproximadamente, 300 kDa expressa nas formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas ao longo da região de contato entre o flagelo e o corpo do parasita (COTRIM et al., 1990; COTRIM et al., 1995); e) **JL7**, uma proteína com peso molecular superior a 170 kDa, expressa nas formas epimastigotas e tripomastigotas (IBANEZ et al., 1988; LEVIN et al., 1989).

A grande diversidade de técnicas e de preparações antigênicas, os diferentes critérios empregados tanto na escolha do valor do “cut-off” dos testes bem como para a seleção dos soros utilizados para avaliar a eficácia das reações estão entre os fatores que têm dificultado a interpretação dos resultados sorológicos para a Doença de Chagas obtidos por diferentes laboratórios. Em vista disto, é de suma importância a realização de estudos multicêntricos para avaliar a eficácia das reações sorológicas e/ou das preparações antigênicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas. Neste sentido, um dos estudos mais completos, financiado pela Organização Mundial da Saúde, envolvendo nove laboratórios de quatro países (Argentina, Brasil, Colombia e Estados

Unidos da América), teve como objetivo avaliar o potencial diagnóstico para a Doença de Chagas de três frações antigênicas purificadas (GP-57/51, GP 90 e neuraminidase) e dezoito proteínas sintéticas recombinantes, utilizando uma bateria de 50 soros codificados, incluindo soros de pacientes chagásicos, de pessoas sadias e de pacientes com infecções heterólogas (MONCAYO & LUQUETTI, 1990). Com relação as frações purificadas, os melhores resultados foram obtidos com reações empregando o antígeno GP 57/51, com sensibilidade e especificidade de 79% e 100%, respectivamente. Reações empregando neuraminidase e GP 90 como antígenos apresentaram sensibilidades inferiores a 30% e especificidades de 95% e 62%, respectivamente. O desempenho das proteínas recombinantes, particularmente a dos antígenos CRA, B13 e H49, foi superior aquele obtido com antígenos purificados. De acordo com os resultados apresentados, a sensibilidade e a especificidade obtidas com o antígeno CRA foram de 100%. Os antígenos B13 e H49 apresentaram sensibilidade de 97% e especificidade de 100% e 95%, respectivamente. Embora o antígeno CRA tenha sido considerado o melhor reagente, cumpre ressaltar que, na avaliação das reações com esta proteína recombinante, quatro resultados duvidosos foram considerados positivos.

Outros estudos têm, também, mostrado que soros de pacientes chagásicos crônicos podem apresentar níveis não detectáveis de anticorpos específicos para vários antígenos recombinantes, incluindo o CRA, o FRA, o B13 e o H49 (ALMEIDA et al., 1990; KRIEGER et al., 1992; PARANHOS - BACALLA et al., 1994). Alguns autores têm obtido bons resultados com a mistura de antígenos recombinantes. Almeida et al. (1990) e Krieger et al. (1992), por exemplo, testando soros de pacientes chagásicos crônicos, encontraram reações sorológicas com 100% de sensibilidade quando uma mistura de CRA e FRA foi utilizada como antígeno, enquanto que resultados falso-negativos foram encontrados quando as reações foram realizadas com o CRA ou com o FRA.

O sistema F.A.S.T. - ELISA, designado inicialmente para a identificação de anticorpos monoclonais (SCHEINBERG et al., 1983), tem sido adaptado para a detecção de anticorpos específicos em várias doenças de interesse médico, humano e veterinário (IANCONESCU, 1985; HANCOCK & TSANG, 1986; CAMPBELL et al., 1987;

HYLLYER & GALANES, 1991; ASHFORD et al., 1993). No presente trabalho, o referido sistema foi utilizado para o desenvolvimento de uma técnica de ELISA rápida e quantitativa para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas, empregando uma fração antigênica do *T. cruzi* purificada por cromatografia de troca iônica. O bom desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, mais a simplicidade e rapidez, evidenciam que a técnica de ELISA, por nós desenvolvida, pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas. Levando em consideração as suas características, a técnica poderia ser utilizada tanto em laboratórios de pesquisa como de rotina. O sistema F.A.S.T. - ELISA poderia, também, ser potencialmente útil para a detecção de anticorpos contra outros antígenos relevantes de *T. cruzi*.



6. Conclusões

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma técnica imunoenzimática (ELISA) quantitativa rápida para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas.

Os resultados do nosso trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. O fracionamento do extrato bruto de *Trypanosoma cruzi*, por meio de cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, permitiu a purificação de uma fração do parasita apresentando alta atividade antigênica específica com soros de pacientes com Doença de Chagas e baixa reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose.
2. Um sistema comercial para reações de ELISA - "Falcon assay screening test" (F.A.S.T. - ELISA) e a fração do *T. cruzi* purificada por cromatografia de troca iônica, foram utilizados para o desenvolvimento de uma técnica de ELISA rápida e quantitativa para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, apresentando 98% de sensibilidade e 99% de especificidade para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas.
3. O bom desempenho, em termos de sensibilidade e especificidade, mais a simplicidade e rapidez, evidenciam que a técnica de ELISA, por nós desenvolvida, pode ser de grande utilidade para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas.



7. Summary

Chagas' disease, an infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is generally asymptomatic or is associated with mild, non-specific clinical manifestations in immunocompetent subjects. Severe cardiac and/or digestive system abnormalities may develop in chronically infected patients, but these clinical manifestations are usually preceded by many years of asymptomatic infection. For this reason, the clinical diagnosis should always be considered in an epidemiological context and confirmed by laboratory data.

The diagnosis of chronic Chagas' disease is generally based on detecting specific antibodies, since the detection of circulating parasites is often difficult in view of the low levels of parasitemia.

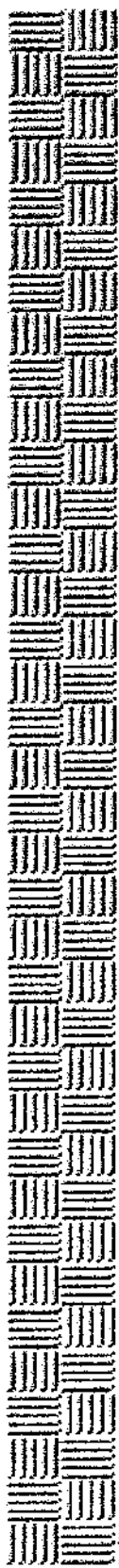
The purpose of this study was to develop a rapid and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Chagas' disease. Considering that the performance of an immunological technique is highly dependent on the antigen used, a *T.cruzi* crude extract was fractionated by affinity chromatography (Sephacel 4B-lentil lectin) and ionic exchange chromatography (DEAE-Sephacel) in an attempt to identify fractions with both a high specific antigenic activity and a low cross-reactivity. One fraction of the parasite extract obtained by chromatography on DEAE-Sephacel was selected for further study based on its reactivity with sera from patients with Chagas' disease and leishmaniasis.

The ELISA procedure was standardized using the Falcon assay screening test (FAST-ELISA®). The F.A.S.T. system has appropriate plates for all reaction steps, including a plate with a plastic lid to which are fixed 96 polystyrene beads that fit into the corresponding wells in the plate. For the assay, the lid containing the beads coated with *T. cruzi* antigen was sequentially transferred, after appropriate washings, to plates containing the serum samples to be tested, the conjugate (anti-human IgG labelled with peroxidase), and the substrate system (tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide). In the serum, conjugate and substrate incubation steps (5 minutes each at room temperature), the plates were placed on an orbital shaker and were continuously agitated. The absorbance of the

reactions was measured at 630 nm in the plate containing the substrate. Positive serum standards containing known concentrations of antibody to *T. cruzi*, expressed in activity units per ml (U/ml), were included in all assays. Each serum sample was tested in triplicate and the mean absorbance was transformed into U/ml using the standard curve.

In a comparative study, the ELISA technique and an indirect immunofluorescence test (IIF) were used to search for *T. cruzi*-specific IgG antibodies in 50 patients with chronic Chagas' disease, 58 patients with heterologous infections and 20 healthy controls. The ELISA technique exhibited 98% sensitivity and 99% specificity, whereas the sensitivity and specificity of the IIF test were 92% and 96%, respectively.

The excellent performance with regard to sensitivity and specificity, simplicity, and short assay time make the F.A.S.T.-ELISA a potentially useful technique for the immunodiagnosis of Chagas' disease.



8. Referências bibliográficas

1. AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. & CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J. Parasitol.** **65**: 507-14, 1979.
2. ALMEIDA, E.; KRIEGER, M.A.; CARVALHO, M.R.; OELEMANN, W. & GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.** **85**: 513-7, 1990.
3. ARAÚJO, F.G. Diagnostic tests for Chagas' disease. Perspectives for confirmatory tests. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 165-78.
4. ARAÚJO, F.G.; CHIARI, E. & DIAS, J.C.P. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. **Lancet** **ii**: 246-9, 1981.
5. ASHFORD, D.A.; BADARÓ, R.; EULÁLIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M.G. & DAVID, J.R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon assay screening test - enzyme - linked immunosorbent assay (F.A.S.T - ELISATM) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **48**: 1-8, 1993.
6. ÁVILA, H.A.; PEREIRA, J.B.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.M. & SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 2421-6, 1993.

7. BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, H.S; ROCHA, T. ; SODRÉ, I & SODRÉ, A.
Incidência da transmissão congênita da Doença de Chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino (Salvador, Bahia). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 14: 131-4, 1972.
8. BONGERTZ, V. & DVORAK, J. A. *Trypanossoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 32: 716-22, 1983.
9. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-54, 1976.
10. CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *American Trypanosomiasis*. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 8: 227-34, 1966.
11. CAMARGO, M.E. An appraisal of Chagas' Disease serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 165-78.
12. CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. & SIQUEIRA, G. R. V. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of *American Trypanosomiasis* **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 15: 81-5, 1973.
13. CAMARGO, M.E & SOUZA, S.L. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for *American Trypanosomiasis* serodiagnosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 8: 255-8, 1966.

14. CAMPBELL, G.H.; ALEY, S.B.; BALLOU, W.R.; HALL, T.; HOCKMEYER, W.T.; HOFFMAN, S.L.; HOLLINGDALE, M.R.; HOWARD, R.J.; LYON, J.A., NARDIN, E.H.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; TSANG, V.C.W.; WEBER, J.L.; WELLEMS, T.E.; YOUNG, J.F & ZAVALA, F. Use of synthetic and recombinant peptides in the study of host-parasite interactions in the malarias. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **37**: 428-44, 1987.
15. CERISOLA, J.A.; FATALA CHABEN, M. & LAZZARI, J. Test de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Prens. Med. Argent.** **44**: 1761-67, 1967.
16. CHAFFEE, E.F.; FIFE JR, E.H. & KENT, J.F. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **5**: 163-71, 1956.
17. CHIARI, E. Diagnostic tests for Chagas' disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 153-164.
18. CHOCAIR, P.R.; SABBAGA, E.; AMATO NETO, V.; SHIROMA, M. & DE GOES, G. M. Transplante de rim: Nova modalidade de transmissão da Doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** **23**: 280-2, 1981.
19. CLARKE, A.E. & HOGGART, R.M. The use of lectins in the study of glycoproteins. In: Marchalonis, J.J. & Warr, G.W. Eds. **Antibody as a tool. The applications of immunochemistry**. A Wiley-Interscience Publication, New York, 1982, pp 347-401.

20. COSTA, C.H.N; COSTA, M.T; WEBER J.N; GILKS, G.F; CASTRO, C. & MARSDEN, P.D. Skin reactions to bug bites as a result of xenodiagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 75:405-7,1981.
21. COTRIM, P.C.; PARANHOS- BACCALA, G.; SANTOS, M.R.; MORTENSEN, C.; CANO, M.I.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M.E.; MORTARA, R.A. & FRANCO DA SILVEIRA, J. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi* . **Mol. Biochem. Parasitol.** 71: 89-98, 1995.
22. COTRIM, P.C.; PARANHOS, G.S.; MORTARA, R. A.; WANDERLEY, J.; RASSI, A.; CAMARGO, M.E. & FRANCO DA SILVEIRA, J. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. **J. Clin Microbiol.** 28: 519-24, 1990.
23. DIAS, J.C.P. Control of Chagas' Disease in Brasil. **Parasitol. Today** 3:336-41, 1987.
24. DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas'disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 49-80.
25. DRAGON, E.A.; BROTHERS, V.M.; WRIGHTSMAN, R.A.; MANNING, J. A Mr 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas'disease diagnostic antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.** 16:213-29, 1985.
26. FERRAZ, A.S. & FIGUEIREDO J.F.C. Transmission of Chagas'disease through transplanted kidney: Occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 35: 461-3, 1993.

27. FERREIRA, A. W. Tests for Chagas' disease serodiagnosis: A Review, In : Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 179-93.
28. FERREIRA, A.W.; BELEM, Z.R.; MOURA, M.E.G. & CAMARGO, M.E. Aspectos da padronização de testes sorológicos para a Doença de Chagas: Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **33**: 123-8, 1991.
29. FIFE JR. E.H. & MUSCHEL, L.H. Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proc. Soc. Exp. Biol. (NY)** **101**: 540-3, 1959.
30. FIGUEIREDO, J.F.C.; MARTINEZ, R.; DA COSTA, J.C.; MOYSES NETO, M.; SUAID, H.J.; & FERRAZ, A.S. Transmission of Chagas' disease through renal transplantation: Report of a case. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **84**: 61-2, 1990.
31. FRANCO DA SILVEIRA, J. *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp 207-18.
32. FRASCH, A.C.C.; CAZZULO, J.J.; ASLUND, L. & PETTERSON, U. Comparision of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol. Today** **7**: 148-51, 1991.
33. FRASCH, A.C.C. & REYES, M.B. Diagnosis of Chagas' disease using recombinant DNA technology. **Parasitol. Today** **6**: 137-9, 1990.

34. FREILIJ, H.L.; CORRAL, R.S.; KATZIN, A.M. & GRINSTEIN, S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.** **25**: 133-7, 1987.
35. FREITAS, J.L.P. & ALMEIDA, J.O. Nova técnica em fixação de complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno de culturas de *T.cruzi*. **O Hospital** **35**: 787-800, 1949.
36. GARVEY, J.S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. In: Benjamim , W. A. Ed. Methods in Immnology: A Laboratory Text for Instruction and Research, Massachusetts, 1977.
37. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. **Brasil Med.** **27**: 225-6, 1913.
38. GUHL, F. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of *South American Trypanosomiasis*. (Chagas'Disease). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro** **85**: 531-2, 1990.
39. HANCOCK, K. & TSANG, V.C.W. Development and optimization of the F.A.S.T-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol. Methods** **92**: 167-76, 1986.
40. HILLYER, G.V. & SOLER DE GALANES, M. Initial feasibility studies of the F.A.S.T - ELISA for the immunodiagnosis of fascioliasis. **J. Parasitol.** **77**: 362-5, 1991.

41. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E. & UMEZAWA, E.S. A rapid slide flocculation test for the diagnosis of *American Trypanosomiasis* using *Trypanosoma cruzi* fragments preserved by lyophilization. Comparison with hemagglutination, immunofluorescence, and complement fixation tests. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **24**:586-9, 1975.
42. HOWARD, I.K.; SAGE, H.J.; STEIN, M.D.; YOUNG, N.M.; LEON, M.A. & DYCKES, D.F. Studies on a phytohaemagglutinin from the lentil. II. Multiple forms of *Lens culinaris* haemagglutinin. **J. Biol. Chem.** **246**: 1590-5, 1971.
43. IANCONESCU, M. Simultaneous screening for two different antibodies in ELISA by combining two solid phases: Microtiter plate and Falcon assay screening test system lid. **J. Immunol. Methods** **76**: 307-16, 1985.
44. IBANEZ, C.F.; AFFRANCHINO, J.L.; MACINA, R.A.; REYES, M.B.; LEGUIZAMON, S.; CAMARGO, M.E.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. & FRASCH, A.C.C. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. **Mol. Biochem. Parasitol.** **30**: 27-34, 1988.
45. ISRAELSKI, D.M.; SADLER, R. & ARAUJO, F.G. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **39**: 445-55, 1988.
46. KATZIN, A.M.; MARCIPAR, A.; FREILIJ, H.; CORRAL, R. & YANOVSKY, J.F. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. **Exp. Parasitol.** **68**: 208-15, 1989.
47. KELSER, R.A. - A complement fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg** **16**: 405-15, 1936.

48. KNIERIM, F. & RUBINSTEIN, P. The detection of Chagas' disease. **Vox Sang** 18: 280-6, 1970.
49. KNIERIM, F. & SAAVEDRA, P. - Técnica de la reacción de hemagglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitoses. **Bol. Chil. Parasit.** 21: 39-44, 1966.
50. KOHL, S.; PICKERING, L.K.; FRANKEL, L. & YAEGER, R.G. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. **Cancer** 50: 827-8, 1982.
51. KOLMER, J.A.; SPAULDING, E. H. & ROBINSON, H.W. Methods for conducting complement fixation tests for syphilis and other diseases. In: **Approved Laboratory Techniques**, New York, Appleton, 1951, p. 797-855.
52. KRIEGER, M.A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J.J.; PEREIRA, J.B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M.R. & GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 46: 427-34, 1992.
53. LAFAILLE, J.J.; LINSS, J.; KRIEGER, M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. & GOLDENBERG, S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 35: 127-36, 1989.
54. LEIGUARDA, R.; RONCORONI, A.; TARATUTO, A.L.; JOST, L.; BERTHIER, M.; NOGUES, M. & FREILIJ, H. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. **Neurology** 40: 850-1, 1990.

55. LEVIN, M.J.; MESRI, E.; BENAROUS, R.; LEVITUS, G.; SCHIJMAN, A.; LEVI-YEYATI, P.; CHIALE, P.A.; RUIZ, A.M.; KHAN, A.; ROSENBAUM, M.B.; TORRES, H.N. & SEGURA, E.L. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 41: 530-8, 1989.
56. LUQUETTI, A.O. Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis: Multicentre trial serological and technical aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro** 85: 497-505, 1990.
57. MADDISON, S.E. The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 7: 93- 105, 1987.
58. MAGNAVAL, J.F.; BROCHIER, B.; CHARLET, J.P.; GONZAGA DOS SANTOS, L. & LARROUY, G. Dépistage de la maladie de Chagas par immunoenzymologie: Comparision de l'ELISA avec l'immunofluorescence et l'hémagglutination indirect chez 976 donneurs de sang. **Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.** 28: 201-13, 1985.
59. MONCAYO, A. & LUQUETTI, A.O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro** 85: 489-95, 1990.
60. MUNIZ, J. & FREITAS, G. - Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação de complemento. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro** 41: 303-33, 1944.

61. PARANHOS - BACALLA, G.S.; SANTOS, M.R.; COTRIM, P.C.; RASSI, A.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M.E. & FRANCO DA SILVEIRA, J. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. **Parasite Immunol.** **16**: 165-9, 1994.
62. PLATA, F.; GARCIA PONS, F. & EISEN, H. Antigenic polymorphism of *Trypanosoma cruzi* : Clonal analysis of trypomastigote surface antigens. **Eur. J. Immunol.** **14**: 392-9, 1984.
63. PRATA, A. A classificação da infecção chagásica no homem. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **23**: 109-13, 1990
64. RANGEL-ALDAO, R.; COMACH, G. ; ALLENDE, Z.; CAYAMA, E.; DELGADO, V.; PIRAS, R.; PIRAS, M.; HENRIQUEZ, D. & NEGRI, S. *Trypanosoma cruzi*: Polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **20**: 25-32, 1986.
65. RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI JR, A.; RASSI, S. G. & RASSI, A.G. Chagas' disease. Clinical features. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. and Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp. 81-101.
66. ROMANA, C. & DIAS, E. Reação de fixação do complemento em Doença de Chagas com antígeno alcóolico de culturas de *Schizotrypanum cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro** **37**:1-10, 1942.

67. ROSSI, C.L.; TAKAHASHI, E.E.H.; TEIXEIRA, A.L.S.; BARROS-MAZON, S. & TREVISAN, R.C.G. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **26**: 83-7, 1993.
68. SALDAÑA, A. & SOUZA, O.E. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: Cross-reaction among their immunogenic components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** **91**: 81-2, 1996.
69. SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51,000 m.w surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **J. Immunol.** **137**: 1336-41, 1986.
70. SCHECHTER, M.; FLINT, J.E.; VOLLER, A.; GUHL, F.; MARINKELLE, C.J. & MILES, M.A. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of *South American Trypanosomiasis* (Chagas' disease). **Lancet ii**: 939-41, 1983.
71. SCHECHTER, M.; LUQUETTI, A. O.; RESENDE, J.M.; RASSI, A. & MILES, M.A. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **79**: 637-40, 1985.
72. SCHECHTER, M.; STEVENS, A. F.; LUQUETTI, A. O.; SNARY, D.; ALLEN, A.K. & MILES, M.A. Prevalence of antibodies to 72-kilodalton glycoprotein (GP 72) in patients with Chagas' disease and further evidence of zymodeme-associated expression of GP 72 carbohydrate epitopes. **Infect. Immun.** **53**: 547-52, 1986.

73. SCHEINBERG, D.A.; PAN, X.; WILSNACK, R. & STRAND, M. Rapid screening of monoclonal antibodies: New "Microstick" radioimmunoassay. **J. Immunol. Methods** **58**: 285-92, 1983.
74. SCOTT, M. T & SNARY, D. *American Trypanosomiasis (Chagas' Disease)* In: Cohen, S. & Warren, K.S., Eds. **Immunology of Parasitic Infections**, Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1982, pp. 261-98.
75. SEAH, S. & MARSDEN, P.D. Complement fixation test in *Trypanosoma rhodesiense* infection with cultured *Trypanosoma cruzi* as antigen. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **64**: 279-83, 1970.
76. SILVEIRA, A.C. & RESENDE, D.F. Epidemiologia e controle de transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **27**: 11-22, 1994.
77. SNARY, D.; FERGUSON, M.A.; SCOTT, M.T. & ALLEN, A.K. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi* : Use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.** **3**: 343-56, 1981.
78. SNARY, D. & HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: Identification of one major glycoprotein. **FEBS Lett.** **100**: 166-70, 1979.
79. STOLF, A.M.S. *Trypanosoma cruzi* antigens in serodiagnosis. In: Wendel, S; Brener, Z.; Camargo, M.E. and Rassi, A. Eds. **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992, pp. 195-205.
80. STORNI, P.D.; BOLSI, F.L. & YANOVSKI, J.F. - Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Medicina** **35**: 67-72, 1975.

81. TACHIBANA, H.; NAGAKURA, K. & KANEDA, Y. Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against *Trypanosoma cruzi* - specific Mr 25000 antigen. **Parasitol Res.** 74: 409-14, 1988.
82. TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M. & WITTNER, M. Chagas' Disease. **Clin. Microbiol. Rev.** 5: 400-19, 1992.
83. TEIXEIRA, A. *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas. In: Dutra, M.R.B. Ed. **Doença de Chagas e outras doenças por tripanossomos**, Editora de Brasília, 1987, pp 15-89.
84. TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi* : Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** 45: 160-8, 1978.
85. TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A. & BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **J. Infect. Dis.** 159: 50-9, 1989.
86. TSANG, V.C.W.; HANCOCK, K. ; KELLY, M.A.; WILSON, B.C. & MADDISON, S.E. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. II. Specificity of antibody responses to the *S. mansoni* microsomal antigen. **J. Immunol.** 130: 1366-70, 1983.
87. TSANG, V.C.W.; TAO, Y. & MADDISON, S.E. Systematic fractionation of *Schistosoma mansoni* urea-soluble egg antigens and their evaluation by the single-tube, kinetic-dependent, enzyme-linked, immunosorbent assay (k-ELISA). **J. Parasitol.** 67: 340-50, 1981.

88. TSANG, V.C.W.; TAO, Y.; QUI, L. & XUE, H. Fractionation and quantitation of egg antigens from *Schistosoma japonicum* by the single-tube kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay (k-ELISA): Higher antigenic activity in urea-soluble than in aqueous-soluble fractions. **J. Parasitol.** **68**: 1034-43, 1982.
89. TSANG, V.C.W.; WILSON, B.C. & PERALTA, J. M. The quantitative, single-tube kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay (k-ELISA) **Methods Enzymol** **92**: 391-403, 1983.
90. VATTUONE, N. H. & YANOVSKY, J.F. *Trypanosoma cruzi*: Agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. **Exp. Parasitol.** **30**: 349-55, 1971.
91. VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D.E. & BARTLET, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. **Lancet** **i**: 426-8, 1975.
92. WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B; CARDOSO, M.A.; OELEMANN, W. & MOREL, C.M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **Am. J. Trop. Med.Hyg.** **51**: 771-7, 1994.
93. WORLD HEALTH ORGANIZATION. TROPIC DISEASE RESEARCH: Progress in international research, 1989-1990. Geneva: Atar, 1991.
94. YAGER, R.G. A method of isolating trypanosomes from blood. **J.Parasitol.** **46**: 288-300, 1960.
95. YODEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer** **3**: 32-5, 1950.
96. ZINGALES, B.; GRUBER, A.; RAMALHO, C.B.; UMEZAWA, E.S. & COLLI, W. Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro** **85**: 519-22, 1990.