

ALDO MATOS

***AVALIAÇÃO DA NOVA FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO
(GARCIA & SOTELO, 1991) PARA O DIAGNÓSTICO DA
DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA***

Universidade Federal de Uberlândia

**Uberlândia - MG
1996**

ALDO MATOS

MON

612.017:616-074

M434a

TES/MEN

705(1)

612.017:616-074 M434a TES
DIRBI - UFU UMU 00292/97



1000167350

**AVALIAÇÃO DA NOVA FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO
(GARCIA & SOTELO, 1991) PARA O DIAGNÓSTICO DA
DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Ramírez Giraldo

Dissertação apresentada ao Conselho do
Curso de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas do Centro de
Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia, como um dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre.

**Uberlândia - MG
1996**

À D. Martha, minha mãe e grande amiga que sofreu e sorriu junto comigo em cada etapa deste trabalho. A certeza de que seu colo me espera mantém calmo o meu coração.

Agradecimentos a:

- Prof. Dr. Luis Eduardo Ramírez Giraldo
- Profa. Eliane Lages Silva
- Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior
- Profa. Dra. Maria Inês Machado
- Profa. Dra. Júlia Maria Costa Cruz
- Prof. Dr. José Roberto Mineo
- Profa. Lívia das Graças V. Lombardi Teodoro
- Funcionários do Laboratório de Parasitologia da FMTM
- Funcionários do Laboratório de Parasitologia da UFU
- Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP
- Hemominas de Uberlândia (MG)
- CNPq

RESUMO

Até hoje não foi encontrado um teste sorológico definitivo para diagnosticar a doença de Chagas, recomendando-se a avaliação da mesma amostra de soro através de duas ou três metodologias. Empregada desde o início do século, a reação de fixação do complemento apresenta-se como um método barato e sensível. Porém, sua difícil e demorada execussão, a instabilidade dos reagentes utilizados e o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e simples como a IFI e a HAI, a estão levando a um gradativo abandono. GARCIA e cols (1995), avaliaram uma nova microtécnica de fixação de complemento (NFC) rápida (2hs) e sensível utilizando reagente estáveis e facilmente preparados (complemento e hemolisina obtidos de *Guinea pig* e eritrócitos humanos), a qual apresentou elevadas sensibilidade e especificidade para diagnosticar a moléstia de Chagas crônica em **soro não diluído**, utilizando um antígeno etanólico obtido a partir de formas epimastigotas do *T. cruzi*.

No presente trabalho, avaliou-se a NFC, comparativamente a IFI, para o diagnóstico da doença de Chagas crônica utilizando quatro preparações antigênicas de *T. cruzi*: um extrato aquoso (GA) e um extrato etanólico (EP) de epimastigotas obtidos de cultura em meio LIT e extratos etanólicos de tripomastigotas (TR) e amastigotas (AM) obtidas de cultura celular. Empregaram-se 236 amostras testadas por IFI: 109 positivas- entre elas 20 com diagnóstico parasitológico- e 127 amostras negativas- entre elas 96 de doadores de sangue, 6 de portadores de lues, 5 de portadores de toxoplasmose, 10 de portadores de leishmaniose tegumentar americana, 8 de portadores de malária e duas de portadores de doença reumática.

Nossos resultados mostram que realizando a titulação do sistema hemolítico em duas etapas rápidas, é possível obter reação positiva em **amostras diluídas** até 1:16. Comparando a NFC com a IFI os melhores limiares de

reatividade encontrados foram a diluição 1:4 para o antígeno AM e 1:2 para os demais antígenos. O antígeno EP mostrou-se ser o mais adequado entre as preparações testadas, pois apresentou co-positividade (CP) com a IFI de 0,92207 e co-negatividade de 0,90000. Os valores de CP para os demais antígenos foram de 0,68807 para o antígeno GA; 0,81118 para TR e 0,84000 para AM, enquanto os valores de CN foram 0,85454 para GA; 0,87719 para TR e 0,90000 para AM.

A NFC mostrou-se ser uma microtécnica semi-quantitativa rápida, sensível, barata e de fácil execução, aplicável ao diagnóstico da doença de Chagas.

ABSTRACT

A definite serologic test to diagnosis Chagas'disease has not been found yet. It has been recommended the evaluation of serum sample through two or three different methodologies. Since the beginning of this century, the complement fixation reaction (CFR) has always been a sensible and unexpensive method. Otherwise its difficult and time-consuming execution, the instability of reagents involved and the development of much more sensible and easier technics like indirect immunofluorescence (IIF) and indirect hemagglutination (IHA), make the CFR obsolete.

Garcia *et al* (1995) evaluated a new microtechnique of complement fixation (NCF) which has been demonstrated rapid (2hs) and sensible using stable reagents easily prepared (complement and hemolysin obtained of *Guinea pig* and humans red blood cells). This technique has presented high sensibility and specificity to diagnosis of chronic Chagas'disease in non-diluted serum, when used an ethanolic antigen obtained from epimastigotes forms of *T. cruzi*.

From this present data we evaluated the NCF comparing it with IIF to diagnosis chronic Chagas'disease using four (4) different antigens of *T. cruzi*: one water soluble extract (G.A.), the second being an ethanol-soluble extract (EP) from epimastigotes obtained from culture in LIT medium and two more ethanolic extracts from tripomastigotes (TR) and amastigotes (AM) obtained from cellular culture. We also used 236 serum samples tested by IIF as follow: 109 positive ones with 20 of them with parasitologic diagnosis; 127 negative samples being: 96 of them normal blood donors, 6 of lues positives, 5 of toxoplasmosis positive, 10 of american tegumentar leishmaniosis, 8 of malaria and two of rheumatic disease.

Our results show that the two-step titration of the hemolytic system achieve positive results in diluted samples up to 1:16. Comparing NCF with IIF we reach the best results of reactivity in 1:4 for the AM antigen and 1:2 for the other antigens. The EP antigen was the most adequate since it presented co-positivity (CP) with IIF of 0,92207 and co-negativity (CN) of 0,90000. The values of CP for the other antigens were of 0,68807 to the GA antigen; 0,81118 to the TR antigen and 0,84000 to AM. The CN values were 0,85454 to GA; 0,87719 to TR and 0,90600 to AM.

The NCF showed to be a fast (2hs), sensible, unexpensive and easy semi-quantitative microtechnique, applicable to Chagas'disease diagnosis.

Abreviaturas e Siglas Utilizadas

Ag	- antígeno
C	- Concordância
CN	- Co-negatividade
CP	- Co-positividade
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FMTM	- Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
HAI	- Hemaglutinação Indireta
IFI	- Imunofluorescência Indireta
LIT	- Liver Infusion Tryptose
mg	- milograma
MG	- Minas Gerais
mL	- mililitro
 mM	- milimolar
NFC	- Nova Fixação de Complemento
NFC-AM	- Nova Fixação de Complemento usando o antígeno AM
NFC-EP	- Nova Fixação de Complemento usando o antígeno EP
NFC-GA	- Nova Fixação de Complemento usando o antígeno GA
NFC-TR	- Nova Fixação de Complemento usando o antígeno TR
RO	- Rondônia
SFB	- Soro Fetal Bovino
SIDA	- Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
UFOP	- Universidade Federal de Ouro Preto
UFU	- Universidade Federal de Uberlândia
µg	- micrograma
µL	- microlitro

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	17
III - MATERIAIS E MÉTODOS	19
IV - RESULTADOS	28
V - DISCUSSÃO	63
VI - CONCLUSÕES	74
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
VIII - APÊNDICE	

I - INTRODUÇÃO

I.1 - A DOENÇA DE CHAGAS

Não obstante as recentes conquistas no combate a sua transmissão, a doença de Chagas ainda permanece entre as principais endemias da América Latina. DIAS (1993) avaliou que, aproximadamente, 100 milhões de latino-americanos vivem sob o risco de contrair a Tripanosomíase Americana e que algo em torno de 16 a 18 milhões já se encontram infectados.

Descoberta nos primórdios deste século por Carlos Chagas, esta doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da família *Tripanosomatidae* e pertencente ao subfilo *Schizotrypanum*. Este parasita necessita de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado (vetor) para realizar com êxito seu ciclo biológico, desenvolvendo-se no primeiro sob a forma de amastigota (intracelular) ou tripomastigota sanguínea (extracelular) e no segundo, sob a forma de epimastigota ou tripomastigota metacíclica, sendo esta última infectante para os mamíferos.

Os vetores utilizados pelo *T. cruzi* são hemípteros hematófagos pertencente à família *Reduviidae*, que se contaminam ao ingerir formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Embora já se tenham descrito mais de cinqüenta espécies de triatomíneos com infecção natural pelo *T. cruzi*, apenas um número próximo de doze têm importância epidemiológica, entre eles o *Triatoma infestans* e o *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul e *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* na Colômbia, Venezuela e América Central.

Entre os hospedeiros vertebrados silvestres encontram-se uma série de mamíferos, entre eles membros das ordens: *Marsupialia* (gambás), *Edentata* (tatus), *Lagomorpha* (lebres), *Rhodentia* (cotia), etc. Estes achados, além de confirmarem o caráter zoonótico da doença, quando analisados em conjunto com o comportamento sinantrópico dos vetores, permitem entender a existência de um

ciclo domiciliar e outro peridomiciliar que se integram. Isto leva a crer que a Doença de Chagas era, inicialmente, uma enzooose que, com o assentamento de populações humanas em novas fronteiras no meio silvestre, evoluiu como uma antropozoonose e que atualmente pode comportar-se mesmo como uma zooantroponose ou uma zoonose.

Na manutenção do ciclo, a infecção de humanos pelo *T. cruzi* pode ocorrer por transmissão vetorial, transfusional, congênita ou por transplante de órgãos de doadores chagásicos para receptores sadios, levando a quadros clínicos e consequências variadas, destacando-se, por sua gravidade, a cardiomegalia e a dilatação dos órgãos cavitários- principalmente cólon e esôfago. Segundo PRATA (1990), a infecção chagásica no homem pode ser classificada em uma Fase Aguda benígna ou grave e uma Fase Crônica, a qual pode apresentar-se como Forma Indeterminada, Forma Cardíaca, Forma Digestiva, Forma Nervosa ou, ainda, Forma com Exacerbações Agudas. Esta última ocorrendo em pacientes imunocomprometidos, com ressaltada importância nos pacientes que desenvolvem a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

I. 2 - O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

O diagnóstico clínico da doença de Chagas é dificultado pela elevada freqüência de pacientes assintomáticos que apresentam a Forma Indeterminada. Soma-se a isto que, em casos sintomáticos, as manifestações clínicas não podem ser consideradas patognomônicas. Disto decorre a importância dos métodos laboratoriais de diagnóstico parasitológicos e imunológicos, os quais devem ter seus resultados analisados em conjunto com dados clínicos e epidemiológicos. Contudo, apesar de um número considerável de recursos técnicos disponíveis no mercado, o diagnóstico laboratorial ainda se apresenta como uma problemática

sem solução satisfatória, permanecendo como um interessante tema de pesquisa aplicada.

Em levantamento bibliográfico de um total de 203 trabalhos científicos publicados na América Latina, no período de 1984 a 1995, evidenciam-se duas linhas de pensamento no intuito de solucionar este problema: uma propõe solução a curto prazo com emprego de um conjunto de reações sorológicas e outra busca solução a médio e longo prazo com a otimização do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de alta especificidade através dos avanços da biologia molecular. Porém, a carência de recursos financeiros impõe-se como um obstáculo ao emprego generalizado de técnicas imunoenzimáticas ou de biologia molecular, já que a distribuição geográfica desta doença acompanha os menores índices de desenvolvimento econômico nos países da América Latina . Depara-se, então, com um dilema: optar por reações mais sensíveis e de maior especificidade, porém mais onerosas ou optar por reações de menores especificidade e sensibilidade, no entanto, com custos mais adequados às condições econômicas das zonas endêmicas.

I. 2.1 - Métodos de Diagnóstico Parasitológico

Uma vez que o diagnóstico clínico da doença de Chagas não é conclusivo, devem-se utilizar os recursos do diagnóstico laboratorial. Entre as metodologias laboratoriais disponíveis, destacam-se as destinadas ao diagnóstico parasitológico que, apresentando especificidade de 100%, determinam com segurança o paciente chagásico. No entanto, a alta sensibilidade destes métodos na fase aguda da doença diminui concomitantemente ao declínio da parasitemia, dificultando a determinação do paciente não-chagásico, especialmente durante a fase crônica.

I.2.1.1- Métodos Diretos

De baixos custos e apresentando boa sensibilidade na fase aguda, os métodos parasitológicos diretos- entre eles o microhematócrito, o Strout, a pesquisa no creme leucocitário, a gota espessa e o exame direto a fresco- não necessitam de grande aparato técnico ou pessoal altamente qualificado para executá-lo. No entanto, estas metodologias pouco significam para diagnóstico na fase crônica da doença, na qual encontra-se a maioria dos pacientes que procuram os serviços de assistência à saúde com sujeiras de sofrerem da moléstia de Chagas.

I.2.1.1.1- Microhematócrito

DEVIGNAT & DRESSE (1955) foram os primeiros a descrever uma microtécnica para a concentração de tripanosomas por centrifugação, e BENNETT (1962) utilizando a técnica do microhematócrito para diagnóstico rotineiro de protozoários sanguíneos concluiu que a centrifugação não altera a sua morfologia. WOO (1969) utilizou esta técnica em condições laboratoriais para a detecção de tripanosomas, entre eles *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* e *T. evansi*, no sangue e líquor de animais de laboratório infectados. O mesmo autor recomenda o emprego deste método para diagnosticar infecções por *T. cruzi* (WOO, 1971). Com base em uma série de experimentos similares (WOO, 1970, 1971; WOO & KAUFFMAN, 1972; LA FUENTE e cols, 1985; WOO & ROGERS, 1974; WOO & HAWKINS, 1975) determinaram-se as vantagens desta técnica em relação às demais, sobretudo por sua simplicidade, rapidez e sensibilidade. Como descrito por AZOGUE & DARRAS (1995), que trabalharam com recém-nascidos na Bolívia, a sensibilidade do microhematócrito pode chegar a 100% em Chagas congênito, quando feito à repetição por quinze dias.

I.2.1.1.2- Strout

Strout desenvolveu um método de diagnóstico baseado no princípio de que a forma tripomastigota sangüínea do *T. cruzi* migra para o soro durante a formação do coágulo (STROUT, 1962) o qual, foi mais tarde modificado (FLORES *e col.*, 1966). A sensibilidade obtida para este método pode variar de 70%, quando se examina apenas o sedimento da primeira centrifugação (CEDILLOS *e cols.*, 1970), até 100%, quando são examinados os sedimentos das duas centrifugações (EMANUEL & CASTRO, 1983).

O Strout e o microhematócrito são os métodos parasitológicos diretos de escolha para o diagnóstico da doença de Chagas aguda, devido a sua operacionalidade e sua alta sensibilidade. Desta forma, a adoção da pesquisa no creme leucocitário, gota espessa ou exame direto a fresco condiciona-se a necessidades específicas, a saber: o exame direto a fresco permite, com alguma exatidão, quantificar a parasitemia e já a gota espessa, permite avaliar características morfológicas que podem subsidiar a diferenciação entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, uma vez que a infecção por este último tripanosomatídeo pode ocorrer em áreas onde a moléstia de Chagas é endêmica.

I.2.1.2- Métodos Indiretos

Procurando elevar a sensibilidade dos métodos parasitológicos quando realizados em pacientes crônicos ou agudos com baixa parasitemia, desenvolveram-se os métodos indiretos entre os quais citam-se: o xenodiagnóstico, a hemocultura e mais recentemente a xenocultura.

Porém, a elevação da sensibilidade do diagnóstico parasitológico trouxe consigo o ônus da necessidade de um maior aparato técnico, que se traduz em elevação dos custos e menor operacionalidade, uma vez que nenhum dos métodos indiretos de diagnóstico parasitológico pode ser totalmente realizado em laboratórios de análises clínicas rotineiras.

I.2.1.2.1- Xenodiagnóstico

A realização do xenodiagnóstico requer a criação de triatomíneos livres de infecção por *T. cruzi* e um tempo mínimo para obtenção dos resultados de 30 dias, sendo estes os principais inconvenientes da técnica. Dos trabalhos iniciais de BRUMPT (1914) até o presente momento, várias modificações já foram introduzidas nesta metodologia, tais como: a variação do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos (SILVA *et al.*, 1993), a espécie de triatomíneo usado (CERISOLA *e cols.*, 1971; SILVA *et al.*, 1993) e o tempo esperado para leitura. A sensibilidade deste método pode variar de 49.3% (WENDEL *e cols.*, 1992) a 100%, como descrito por SILVA *e cols.* (1993) quando obtiveram dejeções espontâneas de *D. maximus* ou *R. neglectus* e examinaram fezes e urina separadamente. Os dados destes últimos autores referentes à sensibilidade do xenodiagnóstico utilizando ninfas de *R. neglectus* são conflitantes com dados de outros autores, entre eles RAMIREZ (1984) que apontam este triatomíneo como pouco suscetível à infecção experimental por *T. cruzi*, quando comparado a outras espécies

Buscando-se maior subsídio para o estudo parasitológico da fase crônica da doença de Chagas, há mais de 10 anos tenta-se padronizar uma metodologia de xenodianóstico que possibilite uma avaliação da parasitemia. Para este fim, CASTRO *e cols.* (1983) salientam a importância da repetição do xenodiagnóstico, sendo também necessária a leitura individual das dejeções dos

triatomíneos. No entanto, a espécie de triatomíneo utilizada, o método de obtenção das dejeções e talvez mesmo o volume de sangue ingerido pelo vetor podem interferir no resultado do xenodiagnóstico e devem ser levados em consideração para se avaliar a parasitemia. Assim, experimentos para avaliação da parasitemia através do xenodiagnóstico utilizando espécies de triatomíneos diferentes ou metodologias distintas não podem ter seus dados comparados.

I.2.1.2.2- Xenocultura

BRONFEN (1989), inoculando em meio de cultura as dejeções dos triatomínios usados no xenodiagnóstico e previamente deixados em solução esterilizante, observou redução no tempo para leitura dos resultados e aumento da sensibilidade. Porém, CHIARI (1992) sugere que esta técnica não seja utilizada rotineiramente em laboratório, mas sim que seja aplicada na avaliação eventual do xenodiagnóstico.

I.2.1.2.3- Hemocultura

Apesar do *T. cruzi* ser facilmente cultivado em meio acelular que contenha hemoglobina ou derivados, resultados negativos obtidos na década de 50 (PEDREIRA, 1952 e PIFANO, 1954) impediram o uso da hemocultura como metodologia para diagnóstico durante vários anos. CHIARI *et cols.* (1966) utilizando o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) descrito por CAMARGO (1964) encontraram positividade de 31,8% e modificações subsequentes introduzidas na técnica original aumentaram sua sensibilidade. Porém, alguns fatores parecem ser limitantes para a sensibilidade deste método, entre eles o tempo de manuseio da amostra de sangue, o uso de tubos novos para o cultivo e o tempo esperado para examinar a cultura. Para este último fator não houve uniformidade entre o

procedimento adotado por diferentes autores: 150 dias (MINTER - GOEDBLOED, 1978), 120 dias (GALVÃO *e cols.*, 1986) e 45 dias (MOURÃO & MELO, 1975; CHIARI & DIAS, 1975 e CHIARI *e cols*, 1989). Mais recentemente, LUZ *e cols* (1994) modificando a técnica para hemocultura descrita por CHIARI *e cols* (1989), obtiveram uma considerável elevação na sensibilidade, chegando ao valor de 79% com um teste e 94% com três testes. Contudo, mesmo tendo utilizado tubos novos e manipulado as amostras rapidamente, estes autores trabalharam com uma amostragem de pacientes que ainda não haviam utilizado nenhum quimioterápico para tratamento da doença de Chagas, o que pode ter gerado uma tendência à maior positividade das hemoculturas.

I. 2.2 - Diagnóstico Imunológico

Atualmente, apesar de intensas pesquisas no campo da biologia molecular, utilizar um conjunto de reações sorológicas, interpretadas à luz de dados clínicos e epidemiológicos ainda é o melhor e mais barato recurso para diagnosticar a doença de Chagas na sua fase crônica.

Na etapa inicial da infecção, encontram-se anticorpos da classe IgM, os quais são gradualmente substituídos por anticorpos da classe IgG à medida que a doença progride, podendo-se encontrar, ainda, anticorpos da classe IgA, tanto na fase aguda quanto em fase crônica da doença (PRIMAVERA, 1990). Devido às limitações próprias do diagnóstico clínico e do diagnóstico parasitológico, a detecção de anticorpos produzidos contra componentes do *T. cruzi* tem se constituído em uma das principais contribuições para o diagnóstico da doença de Chagas aguda ou crônica, desde sua introdução por GUERREIRO & MACHADO (1913).

As discrepâncias nos resultados obtidos para as mesmas provas sorológicas realizadas em distintos laboratórios levaram à necessidade de normatização do diagnóstico sorológico para a enfermidade de Chagas, o que foi avaliado por CAMARGO *e cols.* (1987). O controle de qualidade dos reativos utilizados mostrou-se um ponto crucial para garantir a fidelidade e reprodutividade dos resultados obtidos. Com esta finalidade, HOSHINO-SHIMIZU *e cols* (1986), desenvolveram um diagrama de verificação para avaliar reativos de hemaglutinação, que pode, perfeitamente, ser aplicado a reagentes de outros métodos imunológicos de diagnóstico.

Os testes sorológicos perdem em especificidade para os métodos parasitológicos, uma vez que podem ocorrer reações cruzadas com outras doenças, parasitárias ou não, tais como amebíase, malária, lues, tuberculose, lepra e leishmaniose (FREITAS *e cols.*, 1979; CERISOLA *e cols.*, 1958; NEAL *e cols.*, 1970; NERY-GUIMARÃES *e cols.*, 1969). Em relação a outros tripanosomas, reações cruzadas são descritas com anticorpos produzidos contra tripanosomas africanos (SEAH & MARSDEN, 1970) e em menor intensidade, com *T. rangeli* (D'ALESSANDRO, 1979). Determinantes antigênicos comuns também podem ser observados em tecidos humanos como miocárdio e nervos (PETRY & EISEN, 1989). Além disso, resultados falso-positivos devido a IgM natural são observados, e possivelmente deve-se à reação com fosfocolina, uma fração antigênica comum a muitos parasitas e bactérias, como *T. cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Toxocara*, etc (LAL & OTTSEN, 1989) ou à presença de Fator Reumatóide. Na tentativa de minimizar as reações cruzadas, vêm-se introduzindo a utilização de抗ígenos purificados,抗ígenos recombinantes e peptídios sintéticos. Entre os抗ígenos purificados estão a GP25 (SCHARFSTEIN *e cols.*, 1985) que apresentou reação cruzada em apenas duas amostras de soro em um total de 246 e a GP72 (SCHECHTER *et al*, 1986) que mostrou-se presente em 148 cepas de origens geográficas e zimodemais

diferentes. Entre os autores que testaram antígenos recombinantes encontram-se ZINGALES *e cols* (1990) que apresentaram resultados promissores com duas proteínas recombinantes avaliadas em radioimunoensaio; LORCA *e cols* (1992) que avaliaram oito proteínas de fusão para um dot blot encontrando de 78% a 95% de sensibilidade e ALMEIDA *e cols.* (1990) que avaliaram dois antígenos recombinantes no teste ELISA. PERALTA *e cols.* (1994), testando dois peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* por ELISA relataram sensibilidade de 99.4% em uma amostragem de 260 soros de moradores do município de Virgem da Lapa(MG).

O diagnóstico sorológico pode permanecer positivo após cura parasitológica, fenômeno comum e geral que, possivelmente, é explicado pela persistência da apresentação de antígenos do *T. cruzi* por células dendríticas (ANDRADE, 1988). Buscando contornar esta situação e romper com a dicotonia entre sensibilidade e especificidade, têm-se avaliado a PCR (Polymerase Chain Reaction Assay) no diagnóstico para doença de Chagas (MOSER, 1989; DIAZ *e cols.*, 1992; RUSSONANDO *e cols.*, 1992; CENTURION-LARA, 1994). Contudo, TEIXEIRA *e cols.* (1991) alertam para a possibilidade de inserção de minicírculos de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) do *T. cruzi* no genoma da célula hospedeira, o que leva à persistência da positividade do PCR a despeito da cura parasitológica.

Apesar das recentes pesquisas explorando técnicas de biologia molecular- tais como síntese de peptídios, recombinação gênica e PCR- no desenvolvimento de métodos para diagnóstico de elevadas sensibilidade e especificidade, os resultados obtidos permanecem, até o momento, equiparáveis àqueles descritos para os métodos sorológicos clássicos.

Entre as provas sorológicas mais utilizadas para o diagnóstico da enfermidade de Chagas estão a Fixação de Complemento (FC), a Imunofluorescência Indireta (IFI) , a Hemaglutinação Indireta (HAI) e o ELISA

(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), as quais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1991).

I.2.2.1- Hemaglutinação Indireta (HAI)

KNIERIM & RUBINSTEIN (1970) avaliaram uma nova técnica de hemaglutinação para o diagnóstico da doença de Chagas, usando hemácias humanas ligadas a antígenos provenientes de um extrato aquoso de epimastigotas e relataram índices de sensibilidade e especificidade comparáveis aos encontrados para a fixação de complemento por CERISOLA *e cols.* (1970). Estes resultados recomendaram o uso da técnica para seleção de doadores e estimularam pesquisas para sua otimização. CAMARGO *e cols.* (1973) descreveram um teste HAI realizado em placa utilizando eritrócitos tipo O tanizados e sensibilizados com um extrato de epimastigotas rompidos por ondas ultrassônicas que, em estudo comparativo em 1430 soros, mostrou resultados similares à Imunofluorescência e Fixação de Complemento. HOSHINO-SHIMIZU *e cols.* (1978) desenvolveram um reagente polissacarídico estável para diagnosticar a fase aguda ou infecções recentes por *T. cruzi* através da HAI que foi, mais tarde, padronizado pelos mesmos autores (HOSHINO-SHIMZU *e cols.*, 1982).

Atualmente existem “kits” comerciais de Hemaglutinação bem padronizados para o diagnóstico da doença de Chagas. Porém a possibilidade de ocorrer resultados falso-positivos limita o uso desta técnica como único recurso para diagnóstico laboratorial.

I.2.2.2- Imunofluorescência Indireta (IFI)

Esta técnica que tem a vantagem de permitir discriminar diferentes classes de imunoglobulinas- IgM, IgG e IgA- foi primeiramente descrita por FIFE &

MUSHEL (1959), os quais usaram como antígeno, formas epimastigotas obtidas de cultura "in vitro". CAMARGO *e cols.* (1966) desenvolveram a técnica para o diagnóstico da doença de Chagas e obtiveram altos índices de sensibilidade e especificidade, o que estimulou sua utilização por outros laboratórios, confirmando o padrão observado pelos autores.

Os resultados obtidos com a IFI foram tão confiáveis que poucas alterações foram introduzidas na técnica, sendo que somente na década de 80 foram retomadas as avaliações de抗ígenos. Observando que a forma evolutiva do *T. cruzi* utilizada interfere na performance da IFI, ARAÚJO & GUPTILL (1984) relataram que a forma amastigota obtida de cultura celular é um antígeno mais sensível que o epimastigota para detecção de IgG. Este relato foi confirmado por PRIMAVERA *e cols.* (1990), que trabalharam com tripomastigotas obtidos de camundongos imunossuprimidos, epimastigotas e amasgutas, para a detecção de IgA, IgM e IgG.

A praticidade deste teste e a possibilidade do uso de reagentes padronizados, além dos altos índices de especificidade e sensibilidade obtidos, são responsáveis pelo emprego desta técnica na triagem de doadores de sangue ou inqueritos soroepidemiológicos.

I.2.2.3- ELISA

VOLLER *e cols.* (1975), descreveram um teste imunoenzimático realizado em microplacas de poliestireno, usando extrato de *T. cruzi* como antígeno. FERREIRA *e cols.* (1979), observaram correlação direta deste teste com a IFI, a FC e HAI. No entanto, persiste nesta técnica a reação cruzada com o *T. rangeli* como descrito por ANTHONY *e cols.* (1979).

Um ponto crítico para esta prova é, sem dúvida, o antígeno. Em sua avaliação, MAGNAVAL *e cols.* (1985) concluíram que o antígeno bruto é mais eficiente para seleção de doadores de sangue. Porém a freqüência de reações cruzadas observadas com este antígeno levou à procura de antígenos purificados. CAMARGO *e cols.* (1986) descreveram, em detalhes, a padronização do ELISA usando como antígeno uma glicoproteína de 25KDa descrita por SCHARFSTEIN *e cols* (1985), relatando queda na freqüência de reações falso-positivas em soro de pacientes acometidos por outras patologias.

ARAÚJO (1985) descreveu um teste dot-ELISA para rápida detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* utilizando antígenos do parasita em tampão salino fixados em papel de nitrocelulose, relatando 100% de especificidade e sensibilidade; porém a amostragem deste autor foi de apenas 38 soros e as únicas reações cruzadas pesquisadas foram com leishmaniose tegumentar americana e toxoplasmose. Este ensaio imunoenzimático tem a vantagem de não necessitar de nenhum equipamento para leitura, sendo aplicável em inquéritos soroepidemiológicos (HUBSCH *e cols.*, 1989).

Devido às altas sensibilidade e especificidade observadas nos testes ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas, FERREIRA *e cols.* (1979) recomendam seu emprego para selecionar doadores de sangue e para confirmar o diagnóstico clínico e os resultados obtidos por ROCHA *e cols.* (1987) os recomendam para o diagnóstico “post mortem”.

I.2.2.4- Fixação de Complemento

A fixação de complemento (FC) teve seu fundamento descrito no início do século por Bordet e Gengou e foi avaliada, para o diagnóstico da doença de Chagas, primeiramente por GUERREIRO & MACHADO (1913), os quais usaram como antígeno um extrato aquoso de *T. cruzi* obtido de baço de filhotes

de cães infectados. KELSER (1936) introduziu o uso de antígenos produzidos a partir de culturas de *T. cruzi*. Na tentativa de diminuir o efeito da anticomplementariedade dos soros, ROMAÑA & DIAS (1942) usaram solventes orgânicos para extrair antígenos solúveis de *T. cruzi* e CHAFEE *e cols.* (1956) padronizaram o uso de antígenos extraído por éter anidro em tampão alcalino. A extração com éter, diminuiu, significativamente, a reação cruzada com Lues e outras reações positivas em soros de indivíduos sadios.

A sensibilidade descrita para esta reação é bastante variada. FREITAS (1951) relatam 95% de sensibilidade, DIAS (1955) relata 98.6% e BATISTA & SANTOS (1959) relatam 100%, sendo que estes últimos autores trabalharam com uma amostragem pequena, o que justifica a sensibilidade máxima. Devido à discrepância entre os títulos sorológicos obtidos pela FC em diferentes laboratórios, ALMEIDA & FIFE (1976) padronizaram a preparação e avaliação de antígenos, bem como a técnica de FC com 50% de hemólise. Apesar dos resultados encorajadores, a difícil padronização dos reagentes e a interferência de soros anticomplementares, favoreceram a gradativa substituição deste bioensaio por outras técnicas sorológicas. Em conclusão, os laboratórios que relegaram a FC ao abandono, não o fizeram em decorrência da performance da reação, mas de sua difícil e demorada execução.

Com intuito de simplificar a metodologia da FC para o diagnóstico de diversas patologias e diminuir os custos dos reagentes, ARANTES (1969 e 1976), testou o emprego de eritrócitos humanos como revelador, não observando decréscimo significativo de especificidade ou sensibilidade. Esta modificação foi resgatada por GARCIA & SOTELO (1991), que avaliando uma Nova Fixação de Complemento (NFC) para o diagnóstico de neurocisticercose, somaram ao método a simplificação de se obter o complemento e a hemolisina da mesma fonte: cobaias sensibilizadas por eritrócitos humanos tipo O. Os autores relataram concordância com o ELISA da ordem de 93% para positivos e 97% para

negativos. Mais tarde, GARCIA *e cols.* (1995) avaliaram a NFC no diagnóstico para Doença de Chagas obtendo sensibilidade e especificidade de 92% e 99% respectivamente. No entanto, estes autores realizaram o teste com apenas um antígeno, usando somente soro não diluído e a única reação cruzada avaliada foi com soro de pacientes com diagnóstico de esquistossomose.

Considerando a necessidade premente de um método de diagnóstico rápido, seguro e a baixo custo em áreas endêmicas para Tripanosomiase Americana, onde a carência de recursos financeiros e de mão-de-obra qualificada são marcantes, propomos avaliar, criteriosamente, a NFC (GARCIA & SOTELO, 1991) no diagnóstico da doença de Chagas, utilizando para tal fim, antígenos preparados a partir de diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*.

II - OBJETIVOS

II.1 - Objetivo Geral:

Avaliar a Nova Reação de Fixação de Complemento (GARCIA & SOTELO, 1991) para o diagnóstico da Doença de Chagas, quanto a sua sensibilidade e sua especificidade, utilizando diferentes抗ígenos provenientes de formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*.

I.2 - Objetivos Específicos:

II.2.1 - Avaliar a Nova Reação de Fixação de Complemento (GARCIA & SOTELO, 1991) com抗ígenos preparados a partir das formas amastigotas e tripomastigota obtidas de cultura em tecidos e epimastigota obtida de cultura em meio LIT (Liver Infusion Tryptose).

II.2.2 - Detectar as possíveis reações cruzadas com soros de pacientes portadores de Malária, Lues, Leishmaniose, Toxoplasmose e Doença Reumática.

II.2.3 - Comparar os resultados obtidos utilizando a Nova Reação de Fixação de Complemento (GARCIA & SOTELO, 1991) com os resultados obtidos através da Imunofluorescência Indireta para *T. cruzi* usando conjugado anti-IgG.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1-SOROS

III.1.1- Positivos para Doença de Chagas:

Foram utilizadas amostras de soro de 89 pacientes atendidos no Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM), com sorologia anti- *T. cruzi* positiva, testadas por Imunofluorescência Indireta (IFI) e Hemaglutinação Indireta (HAI). Também usaram-se amostras de plasmas de 20 pacientes com xenodiagnóstico e/ou hemocultura positiva atendidos no Laboratório de Parasitologia da FMTM.

III.1.2- Negativos para Doença de Chagas:

Foram utilizadas amostras de soro de 127 pacientes com sorologia anti-*T. cruzi* negativa e assim distribuídos:

- a) 96 doadores cadastrados no Hemominas de Uberlândia (MG), com sorologia testados por IFI e HAI.
- b) 06 pacientes atendidos no Hospital Escola da FMTM, com sorologia anti-*T. cruzi* negativa testados por IFI e sorologia positiva para Lues testada pela técnica VDRL.
- c) 05 pacientes atendidos no Hospital Escola da FMTM, com sorologia anti-*T. cruzi* negativa testados por IFI e sorologia positiva para toxoplasmose, fase crônica, testados por IFI.
- d) 10 pacientes com leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e com sorologia anti-*T. cruzi* negativa testados por IFI.
- e) 08 pacientes com diagnóstico parasitológico de malária, provenientes de Porto Velho (RO) e com sorologia anti-*T. cruzi* negativa testados por IFI.
- f) 02 pacientes com pesquisa de fator reumatóide positiva, atendidos no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e com sorologia anti-*T. cruzi* negativa testados por IFI.

As amostras eram colhidas por punção venosa e aliquotadas em volumes de 500 μ L e de 100 μ L sendo, então, armazenadas a -20°C até o momento do uso.

III.2 -ANTÍGENOS

III.2.1- Obtenção dos Antígenos

Os antígenos foram obtidos a partir da cepa Y do *T. cruzi* mantida em camundongos no biotério do Laboratório de Parasitologia da FMTM, por repiques a cada oito dias, até o momento da inoculação em meio de cultura.

III.2.1.1- Tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir de cultura celular mantida no Laboratório de Parasitologia da FMTM.

Para ativação e manutenção da cultura utilizou-se monocamada de células L929, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e meio HAM F-12 com HEPES BUFFER 20mM e L-glutamina produzido por INTERLAB, suplementado com 10% de SFB. A cultura foi mantida em estufa regulada para 37°C e atmosfera de 5% CO₂.

As formas tripomastigotas foram isoladas a cada três dias e armazenadas em freezer a -70°C até o momento de serem processadas.

III.2.1.1.1- Isolamento das Formas Tripomastigotas

Para isolar as formas tripomastigotas, centrifugou-se o sobrenadante da cultura a 405xg, à temperatura ambiente por cinco minutos, incubando-se, a seguir, a 37°C por sessenta minutos. O sobrenadante desta primeira centrifugação foi, então, centrifugado a 1125xg, à temperatura de 4°C por quinze minutos e o sedimento assim obtido foi lavado três vezes, nas condições da última centrifugação, com salina esterilizada.

III.2.1.2- Amastigotas

As formas amastigotas foram obtidas de cultura celular mantida no Laboratório de Parasitologia da FMTM, nas mesmas condições em que foi mantida a cultura destinada à obtenção de tripomastigotas.

As formas amastigotas foram isoladas a cada seis dias e armazenadas em freezer a -70°C até o momento de serem processadas.

III.2.1.2.1- Isolamento das Formas Amastigotas

Para isolar as formas amastigotas a monocamada de células L929 foi tripsinizada e a suspensão de células assim obtida foi centrifugada a 405xg, à temperatura ambiente por cinco minutos e, em seguida, incubada a 37°C por sessenta minutos. O sedimento foi então lavado três vezes, nas mesmas condições de centrifugação, com salina esterilizada.

III.2.1.3- Epimastigotas

As formas epimastigotas foram obtidas a partir de cultura em meio LIT (CAMARGO, 1964) mantida no Laboratório de Parasitologia da FMTM, à temperatura ambiente. Após a ativação, a cultura foi mantida em fase exponencial de crescimento dobrando-se o volume de meio a cada dois dias.

As formas epimastigotas foram isoladas a cada oito dias e armazenadas em freezer a -70°C até o momento de serem processadas.

III.2.1.3.1- Isolamento das Formas Epimastigotas

Para isolar as formas epimastigotas a cultura em meio LIT foi centrifugada a 1125xg, a 4°C por quinze minutos. O sedimento foi lavado três vezes, nas mesmas condições de centrifugação, com salina esterilizada.

III.2.2- Preparo dos Antígenos

III.2.2.1- Antígeno GA (extrato aquoso de epimastigotas)

Este antígeno foi preparado seguindo-se uma metodologia similar à descrita por ALMEIDA & FIFE (1976) para o antígeno número 4, a partir de formas epimastigotas do *T. cruzi*.

No preparo deste antígeno, 50mg de epimastigotas liofilizadas foram triturados em gral com 25mL de benzeno. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 5 minutos sendo, em seguida, centrifugada a 1620xg e temperatura ambiente por 15 minutos. O sedimento foi seco em estufa e, então acrescido de água destilada esterilizada na proporção de 1:100 p/v. A suspensão obtida foi levada ao ultrassom regulado para freqüência de 30Khz por 10 minutos e novamente centrifugado a 1620xg e temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante foi diluído v/v em NaCl 1,7% p/v , envazado em frasco ambar e armazenado a -20°C.

III.2.2.2- Antígeno EP (extrato etanólico de epimastigotas)

Este antígeno foi preparado a partir de formas epimastigotas do *T. cruzi*, segundo a metodologia descrita por GARCIA e cols. (1995).

No preparo deste antígeno transferiu-se uma suspensão rica em parasitas para um gral. Por três vezes, misturou-se acetona e a mistura foi deixada secar a 37°C. Em seguida, o material livre de acetona foi triturado até obtenção de um pó fino com textura de talco, ao qual foi adicionado etanol na proporção de 1mL para cada 100mg de pó. Esta suspensão alcoólica, mantida ao abrigo da luz, foi agitada, vigorosamente, três vezes ao dia por 15 dias. Terminado este prazo, a suspensão foi centrifugada a 1125xg e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

III.2.2.3- Antígeno TR (extrato etanólico de tripomastigotas)

No preparo deste antígeno, 50mg de tripomastigotas liofilizadas foram transferidos para um gral. Por três vezes, misturou-se com acetona e se deixou secar a 37°C. O material obtido foi triturado até se obter um pó fino com textura de talco, ao qual foi adicionado etanol na proporção de 1,5mL para 50mg de pó. Esta suspensão alcoólica, mantida ao abrigo da luz, foi agitada, vigorosamente, três vezes ao dia por quinze dias. Terminado este prazo, a suspensão foi centrifugada a 720xg e temperatura ambiente por cinco minutos. O sobrenadante foi armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

III.2.2.4- Antígeno AM (extrato etanólico de amastigotas)

No preparo deste antígeno, 100mg de amastigotas liofilizadas foram transferidos para um gral. Por três vezes, misturou-se com acetona e se deixou secar a 37°C. O material obtido foi triturado até se obter um pó fino com textura de talco, ao qual foi adicionado etanol na proporção de 2mL para 100mg de pó. Esta suspensão alcoólica, mantida ao abrigo da luz, foi agitada, vigorosamente, três vezes ao dia por quinze dias. Terminado este prazo, a suspensão foi centrifugada a 720xg e temperatura ambiente por cinco minutos. O sobrenadante foi armazenado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

III.2.3.1- Teor Protéico

A concentração de proteínas em cada antígeno foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY, 1956).

III.2.3.2- Teor de Açúcares

A concentração de carboidratos nos抗ígenos foi determinada pelo método enzimático GOD-ANA produzido por LABTEST, lote H535.

III.3- OBTENÇÃO DO COMPLEMENTO-HEMOLISINA

O complemento e a hemolisina foram obtidos conjuntamente no soro de cobaias.

A hemolisina anti-eritrócito humano foi obtida sensibilizando cobaias com eritrócitos tipo O, como adaptado de GARCIA & SOTELO (1991). Para este fim, cobaias de aproximadamente 500g foram inoculadas com 0.5mL de eritrócitos tipo O a 10% em solução salina, por via intraperitoneal, três vezes por semana, por um prazo de três meses. No terceiro dia após a última imunização, os animais foram sangrados totalmente por punção cardíaca, respeitando-se jejum prévio de 12 horas acompanhado de fornecimento de água em abundância. O sangue obtido foi deixado coagular à temperatura ambiente por trinta minutos e terminado este prazo, o coágulo foi solto e deixado retrair por sessenta minutos a 4°C. Centrifugou-se, então, a 720xg e 4°C por 10 minutos e um “pool”de todos os soros foi preparado em banho de gelo, tomando-se o cuidado de não misturar soro hemolisado com soro não hemolisado. O “pool”de soros foi aliquotado em volumes de 0.5mL em frascos para 10mL, liofilizado e armazenado a 4°C.

III.4- TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO-HEMOLISINA

O complemento e a hemolisina foram titulados, conjuntamente e em duas etapas, utilizando dois soros controles positivos e dois soros controles negativos, classificados por IFI e HAI e previamente inativados a 56°C por 30 minutos.

III.4.1- Primeira Etapa

Tomaram-se oito frascos de complemento-hemolisina numerando-os de 1 a 8 e reconstituindo o liofilizado com PBS em volume variando em escala de 1mL, começando com 3mL para o frasco número 1 até 10mL para o frasco número 8. Para ensaiar cada frasco de complemento-hemolisina, adicionaram-se em uma placa de microtitulação com fundo em V, 25µL de soro controle diluído 1:2 em PBS, 25µL do抗ígeno diluído adequadamente em PBS e 50µL de complemento-hemolisina. A placa foi agitada suavemente e incubada a 37°C por 45 minutos. Terminada esta primeira incubação, adicionaram-se 10µL de eritrócitos tipo O na concentração aproximada de 1.3×10^8 hemácias/mL, agitou-se suavemente e se incubou a 37°C por mais 60 minutos. Procedeu-se leitura

visual após bater levemente nos cantos da placa. Escolheu-se para seguir a titulação, o frasco de complemento-hemolisina que possibilitou discriminar os soros controles positivos e negativos.

III.4.2- Segunda Etapa

Em placa de microtitulação com fundo em V, diluiram-se os soros controles em PBS de 1:2 a 1:16 mantendo um volume final de 25 μ L e adicionou-se igual volume de antígeno diluído adequadamente em PBS. A cada conjunto de soros controles diluídos adicionou-se um determinado volume de complemento hemolisina do frasco escolhido na etapa anterior (10 μ L, 15 μ L, 20 μ L, 25 μ L, 30 μ L, 35 μ L, 40 μ L, 45 μ L). A placa foi agitada suavemente e incubada a 37°C por 45 minutos. Terminada esta primeira incubação, adicionaram-se 10 μ L de eritrócitos tipo O na concentração aproximada de 1.3×10^8 hemácias/mL, agitou-se suavemente e se incubou a 37°C por mais 60 minutos. Procedeu-se leitura visual após bater levemente nos cantos da placa. Escolheu-se como volume adequado de complemento-hemolisina aquele que permitiu discriminar os soros controles positivos e negativos em suas mais altas diluições.

Usa-se na reação, o volume de complemento-hemolisina determinado na segunda etapa da titulação destes reagentes. O título assim determinado permanece inalterado por três meses, desde que a liofilização seja bem feita e que os frascos de liofilizado sejam armazenados a 4°C.

III.5- TITULAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Para titular os抗ígenos, foram utilizados dois soros controles negativos e dois soros controles positivos com título determinanado por IFI de 1:80 e 1:640.

Os soros controles previamente inativados a 56°C por 30 minutos, foram diluídos em PBS, diretamente na placa de microtitulação com fundo em V, de 1:2 a 1:16 mantendo um volume final de 25 μ L. A cada conjunto de soros controles diluídos adicionaram-se 25 μ L de uma determinada diluição do antígeno em PBS (1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1:300, 1:400) e volume adequado de complemento-hemolisina. Agitou-se suavemente a placa que, em seguida, foi incubada a 37°C por 45 minutos. Terminada esta primeira incubação, adicionaram-se 10 μ L de eritrócitos tipo O a concentração aproximada de 1.3×10^8 hemácias/mL, agitou-se suavemente e se incubou a 37°C por mais 60 minutos. Procedeu-se a leitura visual após bater levemente nos cantos da placa. Considerou-se como diluição ótima para uso de cada antígeno, aquela que permitiu discriminar os soros controles positivos e negativos.

III.6- METODOLOGIA DA PROVA NFC

A metodologia seguida para a NFC no presente trabalho foi adaptada do protocolo originalmente descrito por GARCIA e cols. (1995). Os soros foram previamente inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos em PBS, diretamente na placa de microtitulação com fundo em V, de 1:2 a 1:16 mantendo um volume final de 25 μ L. Adicionaram-se 25 μ L de antígeno diluído adequadamente em PBS e o volume de complemento-hemolisina determinado na titulação do lote destes reagentes. Agitou-se suavemente e se incubou a 37°C por 45 minutos. Terminada esta primeira incubação, adicionaram-se 10 μ L de eritrócitos tipo O a concentração de 1.3 x 10⁸ hemácias/mL, agitou-se suavemente e se incubou a 37°C por mais 60 minutos. Procedeu-se leitura visual, após bater levemente nos cantos da placa, considerando-se indicativo de reação positiva a ausência de hemólise e classificando-se a intensidade de reação de 1+ a 4+ de acordo com o diâmetro do botão de eritrócitos formado.

III.7- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (teste de referência)

A IFI foi realizada conforme descrito por CAMARGO (1966) utilizando formas epimastigotas do *T. cruzi* formalizadas e fixadas em lâmina preparadas no Laboratório de Parasitologia da FMTM e conjugado anti-IgG, Fluorline G, produzido pela BIOLAB, cujo título determinado foi 1:75.

Adicionaram-se 10 μ L do soro diluído em PBS sobre o antígeno fixado na lâmina seca e incubou-se, em câmara úmida, a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas por 15 mergulhos em PBS, trocando-se o tampão a cada 5 mergulhos e deixadas secar sob um ventilador. Adicionaram-se, então, 10 μ L do conjugado anti-IgG diluído a 1:75 em solução de Azul de Evans 1:4000. Incubou-se, em câmara úmida, a 37°C por mais 30 minutos, lavando-se as lâminas e deixando-as secar como já descrito. Em seguida as lâminas foram montadas com glicerina tamponada a pH 8.5 e observada à microscopia de fluorescência sob luz azul.

O limiar de reatividade considerado foi 1:20 na avaliação dos soros negativos e 1:40 na avaliação dos soros positivos.

III.8- ÍNDICES DE CORRELAÇÃO

A correlação entre os resultados obtidos pela NFC e por IFI foram avaliados através dos índices de co-positividade (CP), co-negatividade (CN) e concordância (C) segundo GUIMARÃES e cols. (1987).

CP= _____
n° de positivos pela NFC

nº de positivos por IFI

$$CN = \frac{nº\ de\ negativos\ pela\ NFC}{nº\ de\ negativos\ por\ IFI}$$

$$C = \frac{(nº\ de\ positivos\ pela\ NFC) + (nº\ de\ negativos\ pela\ NFC)}{(nº\ de\ positivos\ por\ IFI) + (nº\ de\ negativos\ por\ IFI)}$$

IV- RESULTADOS

VI.1- COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS

Foram determinadas as concentrações de proteínas pelo método de Lowry e de açúcares pelo método enzimático GOD-ANA (LABTEST) em cada antígeno preparado para a presente avaliação. Chamou atenção o fato de que, na diluição em que os antígenos foram testados, detectaram-se proteínas apenas no antígeno GA e carbohidratos apenas nos antígenos GA e EP, enquanto que para os antígenos TR e AM não foram detectadas nem proteínas e nem carbohidratos, conforme apresentado na tabela 1.

TABELA 1
Composição bioquímica dos diferentes antígenos testados para NFC

Antígeno	Diluição Ag.	Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	Carbohidratos (mg/dl)
GA	1:1	640,0	1,35
EP	1:100	0,0	1,35
TR	1:10	0,0	0,0
AM	1:10	0,0	0,0

IV.2- TITULAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Cada antígeno foi titulado usando dois soros controles positivos e dois soros controles negativos previamente classificados por IFI. Os resultados da titulação de cada antígeno encontram-se na tabela 2 , observando-se que o antígeno TR apresentou o mais alto título enquanto o antígeno GA apresentou o mais baixo. Ressalta-se que não foi observada relação entre o título obtido para cada antígeno e seus respectivos teores de carbohidratos ou de proteínas.

TABELA 2

Resultados da titulação dos diferentes抗ígenos testados frente a soros controles positivos e soros controles negativos previamente classificados pela IFI

Antígeno	Diluição de uso
GA	1:25
EP	1:100
TR	1:200
AM	1:100

IV.3- AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS NA NFC

Uma vez obtidos os títulos de cada antígeno, testou-se a sua capacidade individual de discriminar os soros positivos e os soros negativos previamente classificados por IFI.

Todos os soros com resultado falso-positivo ou falso-negativo foram repetidos: se o resultado persistia, eram considerados como tal e em caso contrário, eram repetidos uma terceira vez como critério de desempate. Além disso, os soros que apresentaram resultados falso-positivos ainda foram testados para detectar atividade anticomplementar.

IV.3.1- Avaliação do Antígeno GA na NFC

Primeiramente foi determinado o limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno GA, através dos índices de correlação com a IFI. Em seguida, avaliaram-se os resultados obtidos para a NFC entre plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e os resultados obtidos em soros de pacientes portadores de outras patologias, além de se avaliar a correlação entre os títulos obtidos pela NFC e os títulos previamente obtidos por IFI.

IV.3.1.1- Determinação do Limiar de Reatividade para a NFC com o Antígeno GA

Na determinação do limiar de reatividade da NFC usando o antígeno GA foram utilizadas 219 amostras, sendo 109 amostras de pacientes com sorologia positiva e 110 com sorologia negativa previamente classificados por IFI anti- *T. cruzi*. Entre as amostras positivas, 20 eram de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e entre as amostras negativas, 22 eram de pacientes portadores de outras patologias. Os resultados obtidos nestas amostras foram organizados e os índices de co-positividade (CP), co-negatividade (CN) e concordância (C) foram calculados em relação à IFI considerando cada diluição do soro separadamente e seus respectivos valores encontram-se na tabela 3. Observa-se que os valores calculados para CP e C diminuem com a diluição dos soros, enquanto os valores de CN aumentam e que o índice de concordância (C) apresentou um valor máximo de 0,77168 correspondendo à primeira diluição do soro. Estes valores apontam a diluição 1:2 do soro como melhor limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno GA e sugerem que a técnica é pouco sensível quando realizada com este antígeno.

TABELA 3
Índices de correlação entre a NFC e a IFI obtidos com o antígeno GA

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:2	Positivas	75	34	109			
	Negativas	16	94	110	0,68807	0,85454	0,77168
	Total	91	128	219			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:4	Positivas	64	45	109			
	Negativas	13	97	110	0,58715	0,88181	0,73515
	Total	77	142	219			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:8	Positivas	49	60	109			
	Negativas	9	101	110	0,44954	0,91818	0,68493
	Total	58	161	219			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:16	Positivas	43	66	109			
	Negativas	9	101	110	0,39449	0,91818	0,65753
	Total	52	167	219			

CP = Co-positividade

CN = Co-negatividade

C = Concordância

IV.3.1.2- Resultados da NFC Obtidos em Plasmas de Pacientes com Diagnóstico Parasitológico de Doença de Chagas Utilizando o Antígeno GA

Os plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas foram considerados como um controle interno da reação e seus resultados para a NFC, usando o antígeno GA, foram destacados entre os obtidos com as amostras positivas estando apresentados na tabela 4. Nesta tabela observa-se que, na diluição 1:2, apresentada como melhor limiar de reatividade para a NFC, apenas 9 entre um total de 20 amostras de plasmas foram positivas para este teste confirmado sua baixa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 4

Resultados obtidos com o antígeno GA para NFC em plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para doença de Chagas

Diluição do Plasma	Nº de Plasmas testados	Nº de Plasmas com NFC positiva
1:2	20	09
1:4	20	06
1:8	20	06
1:16	20	05

IV.3.1.3- Resultados da NFC Obtidos em Soros de Pacientes Portadores de Outras Patologias Utilizando o Antígeno GA

Entre as 110 amostras de pacientes com IFI anti *T. cruzi* negativa estavam incluídas 5 amostras de portadores de malária, 5 amostras de portadores de leishmaniose tegumentar americana, 5 amostras de portadores de lues, 5 amostras de portadores de toxoplasmose e 2 amostras de pacientes com pesquisa de fator reumatóide positiva. Os resultados obtidos com estes soros são apresentados na tabela 5 onde são observadas falsas reações positivas em três amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, em uma amostra de paciente portador de toxoplasmose e nas duas amostras de pacientes com doença reumática.

TABELA 5
Resultados positivos para NFC obtidos com o antígeno GA
em soros de pacientes portadores de outras patologias

nº de soros	Malária (5)	Leishmaniose (5)	Lues (5)	Toxoplasmose (5)	F. Reumatoíde (2)
Diluição soro					
1:2	00	03	00	01	02
1:4	00	03	00	01	02
1:8	00	03	00	01	02
1:16	00	03	00	01	02

IV.3.1.4- Avaliação da Correlação entre os Títulos Obtidos pela NFC com o Antígeno GA e os Títulos Previamente Obtidos por IFI

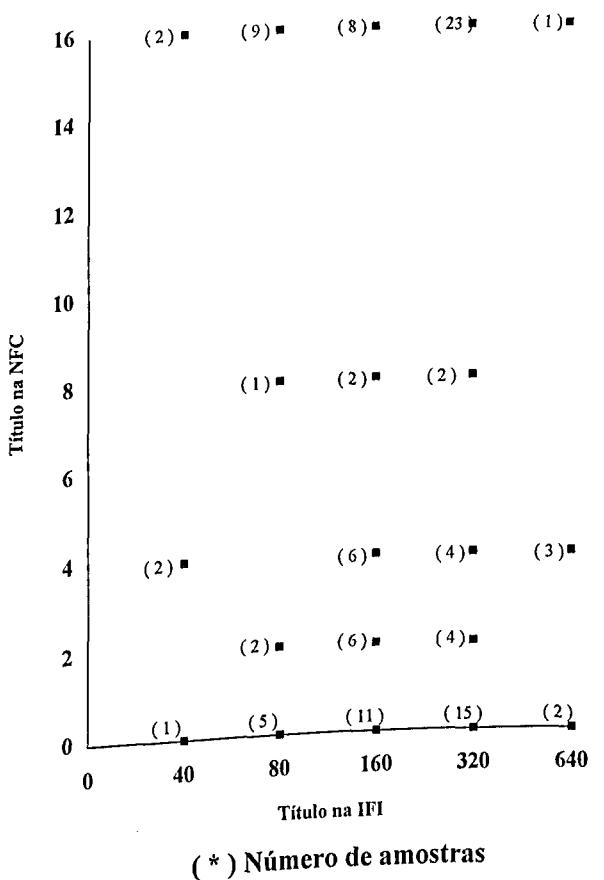
Os títulos obtidos para as 109 amostras positivas através da IFI e da NFC usando o antígeno GA foram organizados e estão apresentados na tabela 6 e na figura 1. Na tabela 6 chama a atenção que de 48 amostras que apresentavam título 1:320 determinado pela IFI, 15 apresentaram resultado negativo para a NFC, 4 apresentaram título 1:2, 4 apresentaram título 1:4, 2 apresentaram título 1:8 e 23 apresentaram título 1:16 para esta técnica utilizando o antígeno GA. Na figura 1, os dados obtidos são apresentados através de um gráfico de dispersão no qual observa-se, claramente, que não houve correlação entre os títulos determinados através das duas metodologias de diagnóstico quando a NFC foi realizada usando o antígeno GA. Ressalta-se que aqueles soros que apresentaram título 1:16 para a NFC negativaram-se na diluição 1:32.

TABELA 6
Avaliação da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com antígeno GA e os títulos obtidos por IFI

Título NFC	Nº de amostras					Total
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
0	01	05	11	15	02	34
1:2	00	02	06	04	00	12
1:4	02	00	06	04	03	15
1:8	00	01	02	02	00	05
1:16	02	09	08	23	01	43
Total	05	17	33	48	06	109

FIGURA 1

Avaliação gráfica da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com antígeno GA e os títulos obtidos por IFI



(*) Número de amostras

IV.3.2- Avaliação do Antígeno EP na NFC

Primeiramente foi determinado o limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno EP, através dos índices de correlação com a IFI. Em seguida, avaliaram-se os resultados obtidos para a NFC entre plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e os resultados obtidos em soros de pacientes portadores de outras patologias, além de se avaliar a correlação entre os títulos obtidos pela NFC utilizando este antígeno e os títulos previamente determinados po IFI.

IV.3.2.1- Determinação do Limiar de Reatividade para a NFC com o Antígeno EP

Na determinação do limiar de reatividade da NFC usando o antígeno EP foram utilizadas 167 amostras, sendo 77 amostras de pacientes com sorologia positiva e 90 com sorologia negativa previamente classificados por IFI anti- *T. cruzi*. Entre as amostras positivas, 6 eram de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e entre as amostras negativas, 18 eram de pacientes portadores de outras patologias. Os resultados obtidos para NFC nestas amostras foram organizados e os índices de co-positividade (CP), co-negatividade (CN) e concordância (C) foram calculados em relação à IFI considerando, cada diluição do soro separadamente e seus respectivos valores encontram-se na tabela 7. Nesta tabela observa-se que os valores calculados para CP e C diminuem com a diluição dos soros, enquanto os valores de CN aumentam e que o índice de concordância (C) apresentou um valor máximo de 0,91017 correspondendo à diluição 1:2 do soro. Estes valores apontam a esta diluição como melhor limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno EP e

sugerem que a técnica apresenta boa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 7

Índices de correlação entre a NFC e a IFI obtidos com o antígeno EP

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
	Positivas	71	06	77			
1:2	Negativas	09	81	90	0,92207	0,90000	0,91017
	Total	80	87	167			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
	Positivas	61	16	77			
1:4	Negativas	03	87	90	0,79220	0,96666	0,88622
	Total	64	103	167			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
	Positivas	39	38	77			
1:8	Negativas	02	88	90	0,50649	0,97777	0,77245
	Total	41	126	167			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
	Positivas	17	60	77			
1:16	Negativas	01	89	90	0,22077	0,98888	0,64071
	Total	18	149	167			

CP = Co-positividade

CN = Co-negatividade

C = Concordância

IV.3.2.2- Resultados da NFC Obtidos em Plasmas de Pacientes com Diagnóstico Parasitológico de Doença de Chagas Utilizando o Antígeno EP

Seis plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas foram considerados como controle interno da reação e seus resultados para a NFC usando o antígeno EP foram destacados entre os obtidos com as amostras positivas, estando apresentados na tabela 8. Observa-se que, na diluição 1:2 apresentada como melhor limiar de reatividade para a NFC, todas as amostras foram positivas para este teste confirmado sua boa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 8

Resultados obtidos con antígeno EP para NFC em plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para doença de Chagas

Diluição do Plasma	Nº de Plasmas testados	Nº de Plasmas com NFC positiva
1:2	06	06
1:4	06	04
1:8	06	03
1:16	06	02

V.3.2.3- Resultados da NFC Obtidos em Soros de Pacientes Portadores de Outras Patologias Utilizando o Antígeno EP

Entre as 90 amostras de pacientes com IFI anti-*T. cruzi* negativa estavam incluídas 4 amostras de portadores de malária, 4 amostras de portadores de leishmaniose tegumentar americana, 4 amostras de portadores de lues , 4 amostras de portadores de toxoplasmose e 2 amostras de pacientes com pesquisa de fator reumatóide positiva. Os resultados obtidos com estes soros são apresentados na tabela 9 onde são observadas falsas reações positivas em três amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, em duas amostras de pacientes portadores de lues, em uma amostra de paciente portador de toxoplasmose e nas duas amostras de pacientes com doença reumática.

TABELA 9

**Resultados positivos para NFC obtidos com antígeno EP
em soros de pacientes portadores de outras patologias**

nº de soros	Malária (4)	Leishmaniose (4)	Lues (4)	Toxoplasmose (4)	F. Reumatóide (2)
Diluição soro					
1:2	00	03	02	01	01
1:4	00	03	00	00	00
1:8	00	02	00	00	00
1:16	00	01	00	00	00

IV.3.2.4- Avaliação da Correlação entre os Títulos Obtidos pela NFC com o Antígeno EP e os Títulos Previamente Obtidos por IFI

Na tabela 10 encontram-se os títulos obtidos para as 77 amostras positivas através da IFI e da NFC usando o antígeno EP. Nesta tabela, chama a atenção que de 31 amostras que apresentavam título 1:320 determinado pela IFI, apenas uma apresentou resultado negativo para a NFC enquanto 4 apresentaram título 1:2, 6 apresentaram título 1:4, 11 apresentaram título 1:8 e 9 apresentaram título 1:16. Na figura 2, tem-se a apresentação gráfica dos mesmos dados da tabela, onde a grande dispersão dos pontos demonstra, claramente, que não houve correlação entre os títulos determinados através das duas metodologias de diagnóstico. Ressalta-se que aqueles soros que apresentaram título 1:16 para a NFC negativaram-se na diluição 1:32.

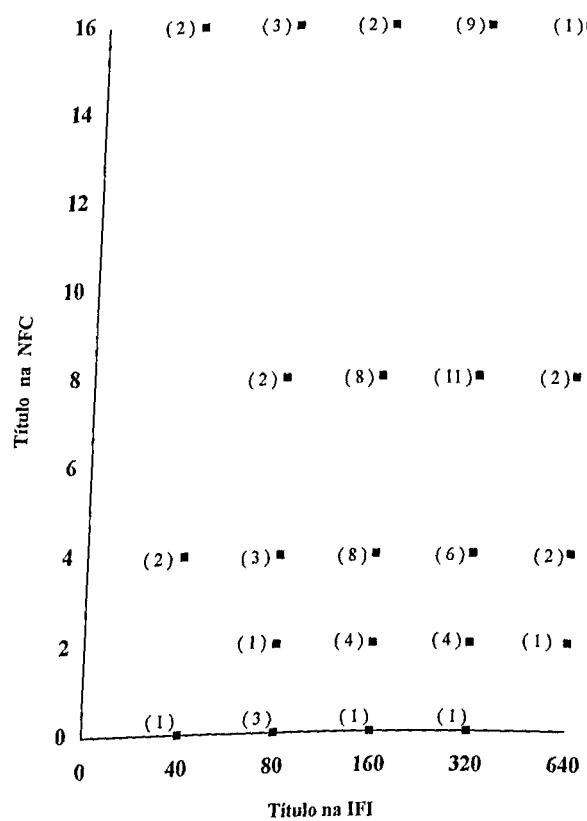
TABELA 10

**Avaliação da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com o antígeno EP e os títulos obtidos por IFI**

Título NFC	Nº de Amostras					Total
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
0	01	03	01	01	00	06
1:2	00	01	04	04	01	10
1:4	02	03	08	06	02	21
1:8	00	02	08	11	02	23
1:16	02	03	02	09	01	17
Total	05	12	23	31	06	77

FIGURA 2

**Avaliação gráfica da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com o antígeno EP e os títulos obtidos por IFI**



(*) Número de amostras

IV.3.3- Avaliação do Antígeno TR na NFC

Primeiramente foi determinado o limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno TR, através dos índices de correlação com a IFI. Em seguida, foram avaliados os resultados obtidos para a NFC entre plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e os resultados obtidos em soros de pacientes portadores de outras patologias, além de se avaliar a correlação entre os títulos obtidos pela NFC utilizando este antígeno e os títulos previamente determinados por IFI.

IV.3.3.1- Determinação do Limiar de Reatividade para a NFC com o Antígeno TR

Na determinação do limiar de reatividade da NFC usando o antígeno TR foram utilizadas 215 amostras, sendo 101 amostras de pacientes com sorologia positiva e 114 com sorologia negativa previamente classificados por IFI anti- *T. cruzi*. Entre as amostras positivas, 15 eram de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e entre as amostras negativas, 18 eram de pacientes portadores de outras patologias. Os resultados obtidos para NFC nestas amostras foram organizados e os índices de co-positividade (CP), co-negatividade (CN) e concordância (C) foram calculados em relação à IFI considerando cada diluição do soro separadamente e seus respectivos valores encontram-se na tabela 11. Nesta tabela observa-se que os valores calculados para CP e C diminuem com a diluição dos soros, enquanto os valores de CN aumentam e que o índice de concordância (C) apresentou um valor máximo de

0,84651 correspondendo à primeira diluição do soro. Estes valores apontam a diluição 1:2 do soro como melhor limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno TR e sugerem que a técnica apresenta boa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 11

Índices de correlação entre a NFC e a IFI obtidos com antígenos TR

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:2	Positivas	82	19	101			
	Negativas	14	100	114	0,81118	0,87719	0,84651
	Total	96	119	215			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:4	Positivas	77	24	101			
	Negativas	09	105	114	0,76237	0,92105	0,84651
	Total	86	129	215			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:8	Positivas	65	36	101			
	Negativas	06	108	114	0,64356	0,94736	0,80465
	Total	71	144	215			

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:16	Positivas	55	46	101			
	Negativas	02	112	114	0,54455	0,98245	0,77674
	Total	57	158	215			

CP = Co-positividade
 CN = Co-negatividade
 C = Concordância

IV.3.3.2- Resultados da NFC Obtidos em Plasmas de Pacientes com Diagnóstico Parasitológico de Doença de Chagas Utilizando o Antígeno TR

Na tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos com os plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas, os quais foram considerados como um controle interno da reação e seus resultados para a NFC usando o antígeno TR foram destacados entre os obtidos com as amostras positivas. Observa-se que, na diluição apresentada como melhor limiar de reatividade para a NFC, as 15 amostras de plasmas foram positivas para este teste confirmado sua boa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 12

Resultados obtidos com o antígeno TR para NFC em plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para doença de Chagas

Diluição do Plasma	Nº de Plasmas testados	Nº de Plasmas com NFC positiva
1:2	15	15
1:4	15	14
1:8	15	12
1:16	15	09

IV.3.3.3- Resultados da NFC Obtidos em Soros de Pacientes Portadores de Outras Patologias Utilizando o Antígeno TR

Entre as 114 amostras de pacientes com IFI anti *T. cruzi* negativa estavam incluídas 4 amostras de portadores de malária, 4 amostras de portadores de leishmaniose tegumentar americana, 4 amostras de portadores de lues , 4 amostras de portadores de toxoplasmose e 2 amostras de pacientes com pesquisa de fator reumatóide positiva. Foram observadas falsas reações positivas em duas amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, em uma amostra de paciente portador de lues, em 3 amostras de pacientes portadores de toxoplasmose e nas duas amostras de pacientes com doença reumática, como apresentado na tabela 13.

TABELA 13

Resultados positivos para NFC obtidos com antígenos TR em soros de pacientes portadores de outras patologias

nº de soros	Malária (4)	Leishmaniose (4)	Lues (4)	Toxoplasmose (4)	F. Reumatoíde (2)
Diluição soro					
1:2	00	02	01	03	02
1:4	00	02	00	02	02
1:8	00	02	00	02	00
1:16	00	02	00	00	00

IV.3.3.4- Avaliação da Correlação entre os Títulos Obtidos pela NFC com o Antígeno TR e os Títulos Previamente Obtidos por IFI

Os títulos obtidos para as 101 amostras positivas através da IFI e da NFC usando o antígeno TR foram organizados e estão apresentados na tabela 14 e na figura 3. Nesta tabela, chama a atenção que de 44 amostras que apresentavam título 1:320 determinado pela IFI, 7 apresentaram resultado negativo para a NFC, 2 apresentaram título 1:2, 2 apresentaram título 1:4, 6 apresentaram título 1:8 e 27 apresentaram título 1:16. Na figura 3, tem-se a apresentação gráfica dos mesmos dados da tabela 14, onde a grande dispersão dos pontos demonstra, claramente, que não houve correlação entre os títulos determinados através das duas metodologias de diagnóstico quando a NFC foi realizada usando o antígeno TR. Ressalta-se que aqueles soros que apresentaram título 1:16 para a NFC negativaram-se na diluição 1:32.

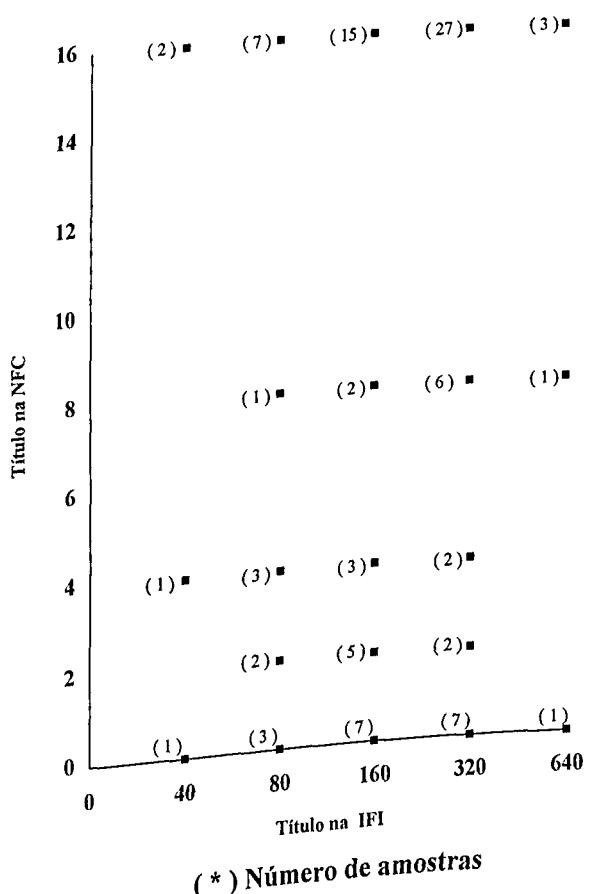
TABELA 14

**Avaliação da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com antígeno TR e os títulos obtidos por IFI**

Título NFC	Nº de Amostras					Total
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
0	01	03	07	07	01	19
1:2	00	02	05	02	00	09
1:4	01	03	03	02	01	10
1:8	00	01	02	06	03	54
1:16	02	07	15	27	05	
Total	04	16	32	44	101	

FIGURA 3

**Avaliação gráfica da correlação entre os títulos obtidos pela NFC com antígeno TR
e os títulos obtidos por IFI**



IV.3.4- Avaliação do Antígeno AM na NFC

Inicialmente determinou-se o limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno AM, através dos índices de correlação com a IFI. Logo a seguir, foram avaliados os resultados obtidos para a NFC entre plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e os resultados obtidos em soros de pacientes portadores de outras patologias, além de se avaliar a correlação entre os títulos obtidos pela NFC utilizando este antígeno e os títulos previamente determinados por IFI.

IV.3.4.1- Determinação do Limiar de Reatividade para a NFC com o Antígeno AM

Na determinação do limiar de reatividade da NFC usando o antígeno AM foram utilizadas 165 amostras, sendo 75 amostras de pacientes com sorologia positiva e 90 com sorologia negativa previamente classificados por IFI anti- *T. cruzi*. Entre as amostras positivas, 6 eram de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas e entre as amostras negativas, 18 eram de pacientes portadores de outras patologias. Os resultados obtidos para NFC nestas amostras foram organizados e os índices de co-positividade (CP), co-negatividade (CN) e concordância (C) foram calculados em relação à IFI considerando cada diluição do soro separadamente e seus respectivos valores encontram-se na tabela 15. Observa-se que os valores calculados para C são de 0,69696 para diluição 1:2 do soro elevando-se a 0,87272 na diluição 1:4 do soro e diminuindo nas diluições seguintes, observando-se o mesmo comportamento para CP. Apenas os valores de CN elevaram-se concomitantemente à diluição dos

soros. Estes valores apontam a diluição 1:4 do soro como melhor limiar de reatividade para a NFC usando o antígeno AM e sugerem que a técnica apresenta boa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 15

Índices de correlação entre a NFC e a IFI obtidos com o antígeno AM

Diluição da amostra		nº testes positivos	nº testes negativos	Total	CP	CN	C
1:2	Positivas	67	08	75			
	Negativas	42	48	90	0,89333	0,53333	0,69696
	Total	109	56	165			
1:4	Positivas	63	12	75			
	Negativas	09	81	90	0,84000	0,90000	0,87272
	Total	72	93	165			
1:8	Positivas	54	21	75			
	Negativas	04	86	90	0,72000	0,95555	0,84848
	Total	58	107	165			
1:16	Positivas	34	41	75			
	Negativas	01	89	90	0,45333	0,98888	0,74545
	Total	35	130	165			

CP = Co-positividade

CN = Co-negatividade

C = Concordância

IV.3.4.2- Resultados da NFC Obtidos em Plasmas de Pacientes com Diagnóstico Parasitológico de Doença de Chagas Utilizando o Antígeno AM

Os plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas foram considerados como um controle interno da reação e seus resultados para a NFC usando o antígeno AM foram destacados entre os obtidos com as amostras positivas estando apresentados na tabela 16. Nesta tabela observa-se que, na diluição apresentada como melhor limiar de reatividade para a NFC, apenas 4 das 6 amostras de plasmas foram positivas, demonstrando que, na verdade, esta técnica apresenta baixa sensibilidade quando realizada com este antígeno.

TABELA 16

Resultados obtidos com antígeno AM para NFC em plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para doença de Chagas

Diluição do Plasma	Nº de Plasmas testados	Nº de Plasmas com NFC positiva
1:2	06	06
1:4	06	04
1:8	06	01
1:16	06	00

IV.3.4.3- Resultados da NFC Obtidos em Soros de Pacientes Portadores de Outras Patologias Utilizando o Antígeno AM

Foram examinadas 90 amostras de pacientes com IFI anti-*T. cruzi* negativa das quais 4 eram de portadores de malária, 4 de portadores de leishmaniose tegumentar americana, 4 de portadores de lues , 4 de portadores de toxoplasmose e 2 amostras de pacientes com pesquisa de fator reumatóide positiva. Os resultados obtidos com estes soros são apresentados na tabela 17 onde observa-se que, quando as amostras foram diluídas a 1:4, obtiveram-se falsas reações positivas em 2 amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana e em 2 amostras de pacientes portadores de toxoplasmose.

TABELA 17

Resultados positivos para NFC obtidos com o antígeno AM em soros de pacientes portadores de outras patologias

nº de soros Diluição soro	Malária (4)	Leishmaniose (4)	Lues (4)	Toxoplasmose (4)	F. Reumatoíde (2)
1:2	01	03	01	02	01
1:4	00	02	00	02	00
1:8	00	02	00	02	00
1:16	00	01	00	00	00

IV.3.4.4- Avaliação da Correlação entre os Títulos Obtidos pela NFC com o Antígeno AM e os Títulos Previamente Obtidos por IFI

Os títulos obtidos para as 75 amostras positivas através da IFI e da NFC usando o antígeno AM foram organizados e estão apresentados na tabela 18 e na figura 4. Na tabela 18 chama a atenção que de 33 amostras que apresentavam título 1:320 determinado pela IFI, 3 apresentaram resultado negativo para a NFC, 2 apresentaram título 1:2, 6 apresentaram título 1:4, 8 apresentaram título 1:8 e 14 apresentaram título 1:16 para esta técnica utilizando o antígeno AM. Na figura 3, tem-se a apresentação gráfica dos mesmos dados da tabela 6, onde a grande dispersão dos pontos demonstra, claramente, que não houve correlação entre os títulos determinados através das duas metodologias de diagnóstico quando a NFC foi realizada usando o antígeno AM. Ressalta-se que aqueles soros que apresentaram título 1:16 para a NFC demonstravam baixa intensidade de reação nesta diluição, negativando-se em 1:32.

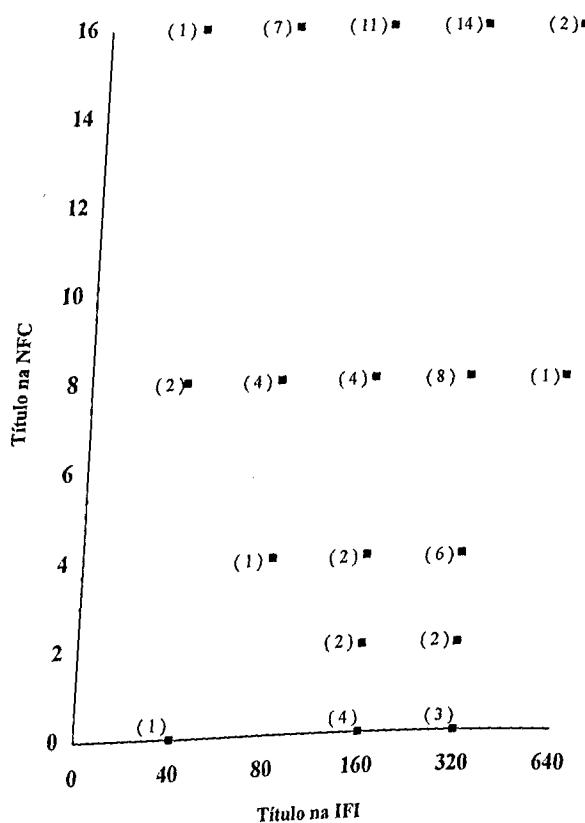
TABELA 18

**Avaliação da correlação entre os títulos pela NFC
com antígeno AM e os títulos obtidos por IFI**

Título NFC	Nº de Amostras					Total
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
0	01	00	04	03	00	08
1:2	00	00	02	02	00	04
1:4	00	01	02	06	00	09
1:8	02	04	04	08	01	19
1:16	01	07	11	14	02	35
Total	04	12	23	33	03	75

FIGURA 4

**Avaliação gráfica da correlação entre os títulos obtidos pela NFC
com o antígeno AM e os títulos obtidos por IFI**



(*) Número de amostras

IV.4- Comparação dos Resultados Falso-positivos e Falso-negativos Obtidos com os Diferentes Antígenos Testados

Cosiderando que foram obtidos antígenos a partir de diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, avaliou-se a coincidência entre os resultados falso-negativos e os resultados falso-positivos encontrados para a NFC com cada antígeno.

IV.4.1- Coincidência dos Resultados Falso-negativos para a NFC entre os Diferentes Antígenos Testados

Os resultados falso-negativos obtidos pela NFC, para os soros utilizados com todos os antígenos testados, foram organizados e são apresentados na tabela 19. Apesar da amostragem não ser mantida constante, observa-se que, em 25 amostras positivas usadas para todos os antígenos, as quais apresentaram ao menos um resultado negativo pela NFC, não houve coincidência total entre os resultados obtidos com os diferentes antígenos testados, sendo que 12 foram negativas com o antígeno GA, 5 com o antígeno EP, 10 com o antígeno TR e 7 com o antígeno AM. Também chama a atenção que foi baixa a concordância entre os resultados obtidos com os antígenos GA e EP, os quais foram preparados a partir da mesma forma evolutiva (epimastigotas) do *T. cruzi*.

TABELA 19

Coincidência dos resultados falsos negativos para NFC entre os diferentes antígenos de *T. cruzi* testados

Nº Amostra	Antígenos			
	GA	EP	TR	AM
01	4+	2+	-	-
07	-	4+	+	-
09	-	+	-	-
28	3+	4+	2+	-
32	2+	4+	3+	2+
48	-	4+	4+	3+
50	-	4+	4+	3+
51	-	4+	2+	+
56	2+	-	3+	-
61	2+	3+	4+	4+
69	4+	-	3+	-
74	4+	4+	4+	2+
78	-	3+	-	4+
80	-	4+	-	+
84	+	2+	-	+
88	-	+	-	+
90	4+	+	-	+
91	+	-	+	+
97	3+	-	2+	3+
99	4+	+	-	3+
110	-	4+	-	+
113	4+	4+	-	2+
122	-	+	-	-
128	-	4+	4+	4+
130	-	-	-	-

* Para o antígeno AM considerou-se a diluição 1:4 da amostra. Para os demais antígenos considerou-se a diluição 1:2

IV.4.2- Coincidência dos Resultados Falso-positivos entre os Diferentes Antígenos Testados para NFC em Soros de Doadores de Sangue.

Os resultados falso-positivos obtidos pela NFC, com cada antígeno, em soros de doadores de sangue foram organizados e apresentados na tabela 20, na qual se observa que as reações falso-positivas foram de baixa intensidade sendo que apenas uma amostra apresentou reação classificada como 2+ enquanto todas as outras foram classificadas como 1+. Ainda chama a atenção nesta tabela, que não houve coincidência total destes resultados obtidos com os diferentes抗ígenos.

TABELA 20

Coincidência dos resultados falso-positivos entre os diferentes抗ígenos de *T. cruzi* testados para NFC em soros de doadores de sangue

Nº Amostra	Antígenos			
	GA	EP	TR	AM
11	-	-	+	-
13	+	-	-	-
14	+	-	-	-
18	-	+	+	-
26	-	+	-	-
30	+	-	-	-
33	2+	-	-	-
34	+	-	-	-
35	+	-	-	+
40	-	-	-	+
45	-	-	+	-
47	-	-	-	+
54	+	-	-	+
55	-	-	-	+
71	-	-	-	+
96	N	N	+	N

* Nesta tabela, foram considerados apenas amostras de doadores de sangue.

** Para o抗ígeno AM considerou-se a diluição 1:4 da amostra. Para os demais抗ígenos considerou-se a diluição 1:2

*** N = não realizado

IV.4.3- Coincidência dos Resultados Falso-positivos entre os Diferentes Antígenos Testados para NFC em soros de Pacientes Portadores de Outras Patologias

As amostras de soros de pacientes portadores de outras patologias podem informar sobre a ocorrência de possíveis reações cruzadas. Por tal motivo os resultados obtidos com estas amostras para NFC usando os diferentes抗ígenos testados, foram organizadas e apresentadas na tabela 21. Observa-se que, apesar da amostragem não permanecer constante, os únicos soros de pacientes portadores de malária que apresentaram resultado falso positivo para a NFC anti-*T. cruzi*, não caracterizaram reação cruzada com esta patologia já que estes soros mostraram-se anticomplementares. Também destacam -se dois casos de reação cruzada com lues para o antígeno EP e um para o antígeno TR, ambos com baixa intensidade. Ainda, são notórias as reações cruzadas encontradas em soros de portadores de leishmaniose ou de toxoplasmose, as quais ocorreram com todos os抗ígenos testados. O antígeno AM mostrou a peculiaridade de não apresentar resultado falso-positivo em soro de pacientes portadores de doença reumática.

TABELA 21

**Coincidência dos resultados falso-positivos entre os diferentes抗igenos de *T. cruzi*
testados para NFC em soros de pacientes portadores de outras patologias**

Nº Amostra	Antígenos			
	GA	EP	TR	AM
M3 [#]	4+	N	N	N
M4 [#]	4+	N	-	-
M9	-	-	-	-
M10	N	N	N	-
M16	-	-	-	-
M19	N	-	-	N
M21	N	N	N	-
M23	-	-	-	-
VD3	-	N	N	-
VD6	-	+	-	N
VD10	-	N	N	-
VD11	-	-	-	-
VD13	-	+	+	-
VD22	N	4+	N	N
L9	4+	N	N	N
L17	4+	4+	N	-
L19	N	N	4+	N
L21 [#]	4+	-	N	N
L22	-	4+	N	4+
L37	4+	N	4+	N
L41	N	N	4+	-
L53 [#]	N	N	4+	-
L59	N	N	-	-
L61	N	-	4+	4+
T1	-	-	4+	4+
T2	-	4+	4+	-
T3	+	-	N	N
T4	-	N	2+	-
T5	-	+	2+	-
R1	2+	-	2+	-
R2	2+	-	-	-

* Para o antígeno AM considerou-se diluição 1:4 da amostra. Para os demais抗igenos considerou-se a diluição 1:2.
** N = não realizado

M = Paciente portador de malária

VD = Paciente portador de lues

L = Paciente portador de leishmaniose tegumentar

T = Paciente portador de toxoplasmose

R = Paciente positivo para fator reumatóide

Soros com atividade anticomplementar

V- DISCUSSÃO

Ainda hoje não foi encontrado um teste sorológico definitivo para o diagnóstico da doença de Chagas, permanecendo a necessidade de avaliar a mesma amostra de soro através de duas ou três metodologias diferentes. Largamente empregada desde o início deste século, a reação de fixação de complemento apresenta-se como um método barato e sensível. Porém, sua difícil e demorada execução, a rápida perda de qualidade dos seus reagentes e o desenvolvimento de novas técnicas simples e sensíveis como a IFI e a HAI resultaram em seu gradativo abandono a partir do final da década de setenta.

GARCIA & SOTELO (1991) procurando resgatar a fixação de complemento como prova para diagnóstico sorológico, apresentaram uma nova metodologia para esta reação, que denominaram Nova Fixação de Complemento (NFC), a qual apresentou bons resultados para o diagnóstico de neurocisticercose e mais tarde, quando avaliada para diagnosticar a moléstia de Chagas, demonstrou-se sensível e com boa especificidade quando realizada em **amostras de soro não diluído** (GARCIA e cols., 1995). Em contraste com a FC clássica, que utiliza antígenos liofilizados, os quais uma vez ressuspensos começam a sofrer inativação, a NFC utiliza como antígeno, um extrato alcoólico, o qual mantém constantes suas propriedades por um ano, mesmo armazenado à temperatura ambiente, permitindo que a reação seja feita rotineiramente sem necessitar retitulá-lo. A NFC utiliza um soro hiperimune de cobaias como fonte simultânea de complemento e hemolisina, sendo que o revelador é uma suspensão de eritrócitos humanos tipo O, facilmente obtidos, enquanto a fixação de complemento clássica apresenta os inconvenientes da necessidade de utilizar fontes distintas de complemento e hemolisina e de que seu revelador é composto de eritrócitos de carneiros. Além disso, a NFC é uma reação rápida, executada em aproximadamente duas horas, ao passo que a FC tradicional demora quase um dia. Procurou-se então avaliar, criteriosamente, a NFC para o diagnóstico da doença de Chagas.

Para obter reação em amostras de soro diluído, modificamos a titulação do sistema hemolítico descrita por GARCIA & SOTELO (1991) passando a realizá-la em duas etapas, o que nos possibilitou determinar títulos sorológicos de até 1:16. As diferenças metodológicas entre esta prova e a fixação de complento clássica, além das discrepâncias nos resultados obtidos por diferentes autores com a FC tradicional, dificultou a comparação de nossos resultados com os relatados na literatura. Procuramos então, centrar a discussão dos nossos resultados na comparação com as publicações mais consistentes encontradas e classificar nossos抗ígenos em dois grupos:抗ígenos preparados a partir de epimastigotas e抗ígenos preparados a partir de formas obtidas de cultura celular (amastigotas e tripomastigotas).

V.1- Composição Bioquímica e Títulos dos Diferentes Antígenos Testados

*

FIFE & KENT (1960) relataram duas frações reativas para FC obtidas a partir de抗ígenos de *T. cruzi*: uma protéica e outra glucídica. Em nossos experimentos, detectamos proteínas apenas no抗ígeno GA e carbohidratos somente nos抗ígenos GA e EP. Não foram encontradas proteínas e nem açúcares, em concentrações detectáveis pelos métodos de doseamento utilizados, nos抗ígenos TR e AM, embora eles tenham apresentado títulos de 1:100 e 1:200 respectivamente, enquanto o抗ígeno GA apresentou título 1:25 e o抗ígeno EP 1:100. O baixo título obtido para o抗ígeno GA, um extrato aquoso de epimastigotas do *T. cruzi*, é compatível com os achados de FIFE & KENT (1960), que ao fazerem extração de抗ígenos em meio aquoso, obtiveram título 1:64 para a fração protéica e 1:8 para fração glucídica. O título encontrado para o抗ígeno EP concorda com o encontrado por GARCIA e cols. (1995) que relataram título 1:95, significando que este抗ígeno foi perfeitamente reproduzido em nosso trabalho. Quanto aos抗ígenos TR e AM não foram

encontrados valores de títulos relatados para antígenos similares na literatura consultada.

A concentração de carboidratos encontrada no antígeno alcoólico EP é 100 vezes superior a encontrada no antígeno aquoso GA. Uma vez que os antígenos alcoólicos TR e AM apresentaram títulos reativos comparáveis ao título determinado para EP, acreditamos que nesses antígenos existam açúcares que não foram detectados pelo método enzimático de doseamento. ALMEIDA e cols. (1991) relatam que anticorpos contra resíduos de carboidratos, especificamente alfa-galatosil, são encontrados em altas concentrações em chagásicos crônicos. Estes anticorpos, pertencentes à classe IgG, promovem a lise de formas circulantes do *T. cruzi* através da ativação do complemento. A composição bioquímica e os títulos obtidos para os antígenos EP, TR e AM, quando analisados à luz dos relatos destes autores, sugerem que os carboidratos sejam realmente os determinantes antigenicos mais importantes nestes antígenos, os quais foram preparados por extração com etanol. Porém, para o antígeno GA, as proteínas, como descrito por FIFE & KENT (1960) para antígenos aquosos de *T. cruzi*, parecem ser as principais responsáveis pelo poder fixador de complemento do imunocomplexo formado.

V.2- Avaliação dos Antígenos Obtidos a Partir de Epimastigotas

Neste trabalho, foram preparados dois antígenos a partir das formas epimastigotas do *T. cruzi* obtidas por cultivo em meio LIT (CAMARGO, 1964): um extrato aquoso (GA) e um extrato etanólico (EP).

Em nosso estudo, comparamos os resultados obtidos pela NFC usando o antígeno GA (NFC-GA) com os resultados previamente obtidos por IFI. O melhor índice de concordância (C) entre as duas técnicas foi de apenas 0,77168, correspondendo à diluição 1:2 das amostras, a qual passou a ser considerada o

limiar de reatividade para a NFC-GA. O valor da co-positividade obtido foi de 0,68807, sugerindo baixa sensibilidade para a técnica avaliada, o que foi confirmado pelos resultados obtidos com as amostras de plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas, onde apenas 9 entre os 20 amostras de plasmas testados resultaram em teste positivo pela NFC-GA. Avaliando-se os resultados obtidos com amostras de soros de portadores de outras patologias encontraram-se falso-positivos entre os portadores de leishmaniose tegumentar americana, toxoplasmose e doença reumática, porém não com portadores de lues. Estes resultados obtidos com o antígeno GA discordam dos relatos de KAGAN *e cols.* (1979), os quais avaliando quatro lotes de um antígeno aquoso para FC quantitativa preparados a partir de epimastigotas *T. cruzi*, relataram altas sensibilidade e especificidade. Os dados obtidos na NFC-GA também são conflitantes com o parecer de ALMEIDA & FIFE (1976), os quais recomendam o emprego do antígeno nº 4, um extrato aquoso de epimastigotas semelhante ao antígeno GA, para diagnosticar a doença de Chagas crônica. Esta discordância deve-se, possivelmente, a diferenças entre as metodologias da FC clássica e da NFC e ao fato de que ALMEIDA & FIFE (1976) não descreveram detalhadamente a metodologia para a obtenção do antígeno nº 4, a qual procuramos seguir no preparo do antígeno GA, dificultando a reprodução fiel deste antígeno.

GARCIA *e cols.* (1995), utilizaram um antígeno etanólico preparado a partir de formas epimastigotas do *T. cruzi* para avaliar a NFC no diagnóstico da moléstia de Chagas, relatando sensibilidade de 92% e especificidade de 99% quando a reação foi realizada em amostras de soros não diluídos. Em nossos trabalhos reproduzimos o antígeno citado pelos autores, o qual passamos a denominar antígeno EP e avaliamos a NFC realizada em amostras diluídas. Nossos resultados apontam a diluição 1:2 do soro como melhor limiar de reatividade para a NFC empregando o antígeno EP (NFC-EP), na qual o índice de

concordância (C) com a IFI alcançou valor máximo de 0,91017. Nesta diluição, o índice de co-positividade foi de 0,92207, comparável à sensibilidade descrita por GARCIA *e cols.* (1995). Os resultados obtidos nas seis amostras de plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas, confirmam a boa sensibilidade da NFC-EP. No entanto, o valor encontrado para a co-negatividade (CN) foi 0,90000, muito inferior à especificidade de 99% descrita pelos mesmos autores. Tal discrepância é explicada pelo fato de que estes autores avaliaram possíveis reações cruzadas apenas em amostras de soros de portadores de esquistossomose, enquanto que no presente trabalho utilizamos amostras de portadores de outras patologias, encontrando resultados falso-positivos entre pacientes portadores de leishmaniose, lues ou doença reumática.

As reações cruzadas observadas na NFC-GA e NFC-EP devem-se à ocorrência de determinantes antigênicos comuns entre *T. cruzi* e *Leishmania* (CHILLER *e cols.*, 1990) e entre *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii* (LAL & OTTSEN, 1989). A reação cruzada observada na NFC-EP entre soros de portadores de lues pode ser devido à permanência, no antígeno EP, de lípides relacionados com a cardiolipina (CHAFEE *e cols.*, 1956), indicando que a deslipidização com acetona não foi muito eficiente. As reações falso-positivas encontradas em soros de portadores de doença reumática devem-se à presença do fator reumatóide que é uma imunoglobulina da classe IgM, a qual é boa fixadora de complemento, direcionada contra determinates presentes na porção Fc das imunoglobulinas da classe IgG.

Não foi observada correlação entre os títulos obtidos pela NFC-GA ou NFC-EP e os títulos previamente determinados por IFI, sugerindo pequena participação dos determinates antigênicos de superfície da forma epimastigota na composição do extrato aquoso (GA) ou do extrato etanólico (EP).

V.3- Avaliação dos Antígenos Obtidos a Partir de Cultura Celular

No presente trabalho foram avaliados para a NFC, dois antígenos etanólicos preparados a partir de formas obtidas de cultura celular do *T. cruzi*: um produzido a partir de tripomastigotas, o qual denominamos TR e outro a partir de amastigotas e que chamamos de AM.

NEVA & GAM (1977) avaliaram lotes de antígenos aquosos para FC preparados a partir de um macerado de cultura celular de *T. cruzi*, cepa Ernestina, relatando títulos para os antígenos que variaram de 1:8 a 1:50 e reações positivas em amostras de soros diluídos até 1:256. Os autores encontraram reação cruzada em amostras de soro de portadores de leishmaniose e lues até a diluição 1:8, relatando ainda reações falso-positivas devido a determinantes antigênicos da célula utilizada no cultivo até a diluição 1:32. No presente trabalho, o melhor limiar de reatividade encontrado para a NFC utilizando o antígeno TR (NFC-TR) foi a diluição 1:2 das amostras, na qual a concordância (C) com a IFI foi de 0,8465 e os 15 plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas apresentaram reação positiva, indicando que a técnica apresenta boa sensibilidade. Porém, nesta diluição a co-negatividade (CN) foi de apenas 0,87719 e observaram-se reações falso-positivas em soros de portadores de leishmaniose, lues, toxoplasmose e doença reumática. Nossos dados discordam dos resultados de NEVA & GAM (1977), pois o máximo título sorológico que encontramos na NFC-TR foi 1:16 e apesar da reação cruzada com lues ter desaparecido na diluição 1:4 das amostras de soro, a reação cruzada com leishmaniose permaneceu até a maior diluição.

Com relação ao antígeno AM, não foi encontrada, em levantamento bibliográfico, nenhuma referência à utilização de amastigotas isoladas no preparo de antígenos para FC. Todavia, sua avaliação como antígeno para outras

metodologias de diagnóstico é consistente, sendo que PRIMAVERA *e cols.* (1990) recomendam sua utilização para a pesquisa de imunoglobulinas por IFI e ARAÚJO & GUPTILL (1984) apresentam resultados que recomendam o uso de preparações antigênicas de amastigotas de *T. cruzi* para IFI e ELISA. Nossa antígeno AM, na verdade é composto por amastigotas e resíduos das células L929 provenientes da monocamada celular de cultivo. Na diluição 1:2 das amostras, o valor de co-positividade (CP) foi 0,89333 e a co-negatividade (CN) foi 0,53333 resultando em uma baixa concordância (C) com a IFI, a qual apresentou valor de 0,69696. Reações cruzadas foram observadas em amostras de soros de portadores de malária, leishmaniose, toxoplasmose e lues além de reação falso-positiva devido à presença de fator reumatóide. Porém, as seis amostras de plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas foram positivas nessa diluição. Diluindo-se as amostras a 1:4, perdeu-se um pouco da co-positividade que caiu para 0,84000, mas o valor de CN subiu para 0,90000 resultando em elevação substancial da concordância (C) com IFI, cujo valor passou a 0,87272. Nesta diluição desapareceram as reações cruzadas com malária e com lues e os falso-positivos devido ao fator reumatóide, além de diminuir a freqüência de reações cruzadas com leishmaniose. Estes resultados levaram à escolha da diluição 1:4 como limiar de reatividade para a NFC utilizando o antígeno AM (NFC-AM), embora nesta diluição apenas quatro das seis amostras de plasmas de pacientes determinados parasitologicamente como chagásicos, tenham permanecido positivas por esta reação. A comparação dos nossos resultados com os de NEVA & GAM (1977), sugere que determinantes antigênicos das células de cultivo foram responsáveis, ao menos em parte, pelas reações inespecíficas encontradas em amostras diluídas a 1:2. Já o desaparecimento da reação falso-positiva em soros de portadores de doença reumática, possivelmente devia-se a queda na atividade do fator reumatóide, uma

vez que o antígeno AM foi o último a ser testado e portanto, as alíquotas destas amostras já haviam sido descongeladas por diversas vezes.

Nossas observações para a NFC-AM também discordam dos achados de MATSUMOTO *e cols.* (1993), os quais relatam que as médias geométricas dos títulos obtidos por IFI são duas a quatro vezes maiores para amastigotas em relação a epimastigotas e que o corte da reação é mais claro, sendo menor a subjetividade na leitura das lâminas com esta preparação. No presente trabalho, apesar de se avaliar uma técnica diferente, encontraram-se os mesmos títulos sorológicos com ambos antígenos e o corte da reação foi mais nítido com os antígenos preparados a partir de epimastigotas.

Como já discutido anteriormente, as reações cruzadas com leishmaniose e toxoplasmose, devem-se à ocorrência de determinantes antigênicos comuns entre o *T. cruzi* e *Leishmania* ou *Toxoplasma gondii* e as reações cruzadas com lues, possivelmente deva-se a presença de lípides relacionados à cardiolipina, indicando que a extração com acetona não foi muito eficiente.

Concordando com os achados para os antígenos EP e GA, também não foi encontrada correlação entre os títulos obtidos pela NFC-TR ou pela NFC-AM e os títulos previamente determinados por IFI, sugerindo que, possivelmente, seja pequena a participação dos determinantes antigênicos encontrados na superfície dos epimastigotas na composição dos antígenos TR e AM.

V.4- Considerações Gerais sobre a NFC com os Diferentes Antígenos Testados

Os resultados do doseamento de proteínas e carbohidratos nos diferentes antígenos sugerem que o etanol seja capaz de extrair carbohidratos com determinantes antigênicos importantes a partir das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. Discordando de PELLEGRINO & BRENER (1952), os quais não

observaram reatividade na fração de açúcares extraídos de epimastigotas, encontramos bom poder fixador de complemento na fração glucídica, como demonstram os resultados obtidos com as preparações antigênicas alcoólicas, especialmente com o antígeno EP, os quais concordam com as observações de FIFE & KENT (1960).

ALMEIDA & FIFE (1976) relatam que na maioria dos soros de pacientes chagásicos crônicos, os títulos sorológicos obtidos através da FC variam de 1:1 a 1:18. Salvo as diferenças metodológicas, este relato concorda com os resultados obtidos em nossos experimentos, onde os títulos encontrados para os soros pela NFC variaram de 1:2 a 1:16. Não observamos correlação entre os títulos sorológicos previamente determinados por IFI e os títulos obtidos pela NFC em nenhum dos抗ígenos testados. Isto sugere pequena participação dos抗ígenos de superfície encontrados nas formas epimastigotas do *T. cruzi* na composição das diferentes preparações antigênicas testadas na NFC, independente da forma evolutiva utilizada ou do solvente empregado na extração.

O抗ígeno que demonstrou-se mais sensível foi o extrato etanólico de epimastigotas (EP), cujo valor de CP foi 0,92207 e reconheceu as seis amostras de plasmas de pacientes com diagnóstico parasitológico de doença de Chagas. Já o extrato aquoso GA mostrou-se ser o抗ígeno menos sensível entre as preparações testadas. Comparando os resultados obtidos para as mesmas amostras de soro com os diferentes抗ígenos testados, não foi encontrada concordância total dos resultados falso-negativos; isto é, o mesma amostra positiva que caracterizou uma reação falso-negativa com um抗ígeno foi reconhecida como positiva por outro. O mesmo ocorreu quando foram analisadas as reações falso-positivas em amostra de soro de doadores de sangue. Estes resultados sugerem que foram extraídos determinantes antigênicos distintos a partir das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*. Notadamente, foi baixa a concordância de resultados falso-negativos e falso-positivos entre o extrato

aquoso (GA) e o extrato etanólico (EP) de epimasitigotas, sugerindo que a água e o etanol extraíram determinantes antigênicos diferentes a partir das formas epimastigotas.

Em relação à especificidade, os抗ígenos testados apresentaram valores próximos de co-negatividade (CN) com a IFI e em todos foram observadas reações cruzadas em amostras de soro de pacientes portadores de leishmaniose e toxoplasmose. Porém, somente com o抗ígeno GA, o qual apresentou o menor valor de CN, não foi observada reação cruzada com lues - provavelmente porque a extração de lípidos pelo benzeno foi mais eficiente que a extração com acetona. As reações falso-positivas devido ao fator reumatóide deveriam ser encontradas nos testes com todas as preparações antigênicas, porém não foi detectada no limiar de reatividade escolhido para NFC-AM, talvez em decorrência das condições de estocagem e manuseio das amostras de soro de pacientes portadores de doença reumática.

Em resumo, a NFC mostrou-se ser uma microtécnica quantitativa rápida, de fácil execução, de baixos custos operacionais e sensível para o diagnóstico da doença de Chagas crônica, sendo que o抗ígeno EP destacou-se como a melhor preparação antigênica testada. Tendo em conta estas considerações, é procedente classificar a NFC como uma **Microtécnica Rápida para Fixação de Complemento Semi-quantitativa.**

VI- CONCLUSÕES

- 1- O complemento e a hemolisina, obtidos conjuntamente em cobaias, mostraram-se estáveis e de fácil obtenção e titulação.
- 2- O revelador utilizado na NFC, eritrócitos humanos tipo O, mostrou-se adequado.
- 3- Entre as preparações antigênicas testadas (GA, EP, TR e AM), o extrato etanólico de epimastigotas EP, mostrou-se ser o mais adequado para fins de diagnóstico da doença de chagas crônica através da NFC, apresentando boa sensibilidade e excelente reprodutibilidade.
- 4- Os resultados obtidos com o extrato etanólico de amastigotas AM, indicam ser possível melhorar sua performance preparando o antígeno com formas amastigotas **purificadas** de cultura celular.
- 5- A partir da comparação das reações cruzadas obtidas com o extrato aquoso GA- o qual foi deslipidizado com benzeno- e aqueles obtidos com os extratos etanólicos (EP, TR e AM)- deslipidizados com acetona, acreditamos ser possível elevar a especificidade das preparações antigênicas etanólicas utilizando benzeno como extrator de lípides em substituição à acetona.
- 6- A Nova Fixação de Complemento (NFC) é uma microtécnica semi-quantitativa rápida, sensível, barata e de fácil execução, aplicável ao diagnóstico da doença de Chagas crônica.

00292/97

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. e cols. . Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas'disease and blood bank screening. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 85, n. 4, p. 513-517, 1990.

ALMEIDA, I. C. e cols. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alfa-galactosyl antibodies. J. Immunology, v. 146, n.7, p. 2394-2400, 1991.

ALMEIDA, J.O.; FIFE, E.H. . Método de fijación del complemento estandarizado cuantitativamente para la evaluacion critica de antigenos preparados com *Trypanosoma cruzi*. Publicación científica nº 319, Organizacion Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, N.W. Washington, D.C., EUA, 1976.

ANDRADE, S.G. e cols. . *Trypanosoma cruzi* antigens detected by immunodetection microcopy in the spleen of mice serologically positice but parasitologically cured by chemotherapy (Preliminary report). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 21, n. 1, p. 41-42, 1988.

ANTHONY, R.L. e cols. . Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 28, p. 969-973, 1979.

ARANTES, M.A. . Emprego de hemácias humanas na reação de fixação de complemento em gotas, para exclusão de doadores de sangue. O Hospital, v. 76, n. 1, p. 107-112, 1969.

ARANTES, M.A. . Emprego do sistema hemolítico anti-homem em reação de fixação de complemento para sífilis, moléstia de Chagas e brucelose. Ci. Cult. v. 28, n. 7, suppl., P. 528, 1976.

ARAÚJO, F.G. . A method for demonstration of antibodies to *T. Cruzi* by using antigen-coated nitrocellulose paper strips. Am. J. Trop. Med. Hyg., V. 34, p. 242-245, 1985.

ARAÚJO, F.G.; GUPTILL, D. . Use of antigen preparations of amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., V. 33, p. 362-371, 1984.

AZOGUE, E.; DARRAS, C. . Chagas congenito em Bolivia: Estudio comparativo de la eficacia y el costos de los metodos de diagnostico. Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop., V. 28, n. 1, p. 39-43, 1995.

BATISTA, S.M.; SANTOS, U.M. . Antígeno metílico de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. Hospital, v. 56, p. 1045-1051, 1959.

BENNETT, G. F. . The haematocrit centrifuge for laboratory diagnosis of hematozoa. Can. Jour. Zool., V. 40, p. 124-125, 1962.

BRONFEN, E. e cols., Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 84, n. 2, p. 237-240, 1989.

BRUMPT, E. . O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e em particular, à tripanosomose de Chagas. Am. Paul. Med. Cirurg., v. 3, p. 97-102, 1914.

CAMARGO, M.E. *e cols.* . Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American Trypanosomiasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 15, p. 81-85, 1973.

CAMARGO, E.P.. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I . Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 6, p.93-100, 1964.

CAMARGO, M. E. *e cols.* Fluorescent antibody test for diagnosis of american tripanosomiasis. Technical modification employing preservated culture forms of *T. Cruzi* in slide test. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 8, n. 5, p. 227-274, 1966.

CAMARGO, M.E. *e cols.* . *Trypanosoma cruzi* antibodies, in: Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis, c. 11, p. 368-381, 1986.

CAMARGO, M.E. *e cols.*, Normalizacion del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en las Americas: evaluacion de tres años de colaboracion. Bol. Of Sanit. Panam., V. 102, n. 4, p. 449-463,1987.

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, v. 8, p. 255-258, 1966.

CASTRO, C. e cols. . Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 16, n.2, p. 98-103, 1983.

CEDILLOS, R.A. e cols. . Blood concentration method in the diagnosis of Chagas' disease. Rev. Lat. Am. Microbiol., V. 12, p. 200-203, 1970.

CENTURION-LARA, A. e cols. . Quantification of parasitemia by competitive chain during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Infect Diseases, v. 170, p. 1334-1338, 1994.

CERISOLA, J. A. e cols.. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. Bol. Chil. Parasitología, n. 26, p. 57-58, 1971.

CERISOLA, J.A. e cols. . La reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Pren. Med. Argent., V. 45, p. 1454-1463, 1958.

CERISOLA, J.A. e cols., Imunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução sorológica de pacientes com doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 12, p. 403-411, 1970.

CHAFEE, E.F. e cols. . Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 5, p. 167-171, 1956.

CHIARI, E. e cols. . Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas'disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 22, p. 19-22, 1989.

CHIARI, E. Padronização do xenodiagnóstico. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical, n. 5, suplemento III, p. 40-42, 1992.

CHIARI, E.; BRENER, Z. . Contribuição ao diagnóstico da doença de Chagas na sua fase crônica. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 8, p. 134-138, 1966.

CHIARI, E.; DIAS, J.C.P. . Nota sobre uma nova técnica para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 9, p. 133-136, 1975.

CHILLER, M. e cols IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas'disease and leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 43, n.6, p. 650-656, 1990.

D'ALESSANDRO, A. . Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: "Biology of the Kinetoplastidia" W.H.L. Lundsen; D.A. Evans; eds. Acad Press, London, p. 328, 1979.

DEVINGNAT, R.; DRESSE, A. . Microtechnique simple et rapide de concentration d'ern sang an tripanosomes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., V. 58, p. 366, 1955.

DIAS, F. . Informações acerca de 300 casos da doença de Chagas com período inicial conhecido, fichados no Centro de Estudos de Bambuí. Hospital, v. 47, p. 9-17, 1955.

DIAS, J.C. P. .Chagas'disease control: current status and prospectives. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 88, suppl., p. 93-96, 1993.

DIAZ, C. e cols. . An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. Am. J. Trop. Med. Hyg., V. 46, n. 5, p. 616-623, 1992.

EMANUEL, A.; DE CASTRO, C.N. . Método de Strout utilizando diferentes velocidades de centrifugação no diagnóstico da fase aguda da doença de Chagas. Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop., V. 18, n. 4, p. 247-249, 1985.

FERREIRA, A.W. e cols. . A aplicação do teste ELISA ao diagnóstico sorológico da Doença de Chagas. II . Estudo comparativo com outros testes sorológicos em residentes de região endêmica (Mambai, GO). Abstracts Congresso Internac. Doença de Chagas, p. 211, 1979.

FERREIRA, A.W. e cols. . Aplicação do test ELISA ao diagnóstico sorológico da Doença de Chagas. 1. Estudo comparativo com o teste de imunofluorescência em amostras de sangue colhidas em papel de filtro. Abstracts Congresso Internac. Doença de Chagas, p. 20, 1979.

FIFE, E.H.; KENT, J. F. Protein and carbohydrate complement fixing antigens of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., N. 9, p.512-517, 1960.

FIFE, E.H ; MUSHEL, L.H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. Exp. Biol. (NY), v. 101, p. 540-543, 1959.

FLORES, M.A. e cols. . El metodo de concentración de Strout en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Bol. Chileno de Parasitología, v. 21, p. 38-39, 1966.

FREITAS, J.L.P. . Reação de fixação do complemento para moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Archn Hyg (São Paulo), v. 16, p. 55-94, 1951.

GALVÃO, L.M.C. e cols. Hemoculture repeatedly negative in humans with Chagas'disease displaying negative complement-mediated lysis test after specific treatment suggest cure in infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, V. 81, p. 111, 1981. Proceedings of the XIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas'disease. Caxambú, Brasil, nov. 1986.

GARCIA, E., SOLTELO, J. . A new complement fixation for diagnosis of neurocisticercosis in cerebrospinal fluid. J. Neurology, p. 942-945, 1991.

GARCIA, E.e cols.. Diagnosis of american trypanosomiasis (Chagas'disease) by new complement fixation test. J. Clin. Microbiol., V. 33, n. 4, p. 1034-1035, 1995.

GUERREIRO, C.; MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Med., V. 27, p. 225-226, 1913.

GUIMARÃES, M. C. S. e cols. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. Noticiário. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. V. 20, n. 1, p. 55-58, 1987.

HOSHINO-SHIMIZU, S. e cols. . A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 20, p. 208-212, 1978.

HOSHINO-SHIMIZU, S. e cols. . A study on the reproducibility of a stable lyophilized reagent for the Chagas'disease hemaglutination test: proposals for quality control analysis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v. 24, p. 63-68, 1982.

HOSHINO-SHIMIZU, S. e cols. . Diagrama de verificacion para evaluar reactivos de hemaglutinacion usados en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. Bol. Of Sanit. Panam. V. 101, n. 5, p. 465-476, 1986.

HUBSCH, R. M. e cols. El ensayo inmunoenzimatico en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. I. Estudo comparativo de dos preparaciones antigenicas de *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst. Oswaldo Cruz, v. 83, n.3, p. 277-285, 1989.

KAGAN, I. G. A critical evaluation of four lots of a *Trypanosoma cruzi* antigen by a quantitative complement fixation test. Congr. Intern. Doenç. Chagas, Rio de Janeiro, 1979, p. C-7/C-12.

KELSER, S.A. . A complement fixation test for Chagas'disease employing an artificial culture antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. V. 16, p. 405-415, 1936.

KNIERIM, F.; RUBINSTEIN, P. The detection of Chagas'disease. Vox Sang, v. 18, p. 280-286, 1970.

LA FUENTE C.e cols. . Uso de tubos de microhematocrito para el diagnostico rapido de la enfermedad de Chagas e Malaria. Annales de la Societe Belge de Médecine Tropicale, v. 65, p. 95-99, 1985.

LAL, R.B.; OTTESEN, E.A. . Phosfocoline epitopes on helminth parasites and their presence in the circulaing of infected human patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., V. 83, p. 652-655, 1989.

LORCA, M. e cols. . Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas'disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg., V. 46, n. 1, p. 44-49, 1992.

LOWRY, V. H. *E cols.* Protein measurement with the Folin fenol reagent. J. Biol. Chem., N. 193, p. 265, 1956.

LUZ, Z. M. P. *e cols.* Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical, v. 27, n.3, p. 143-148, 1994.

MAGNAVAL, J.F. *e cols.* . Despistage de la maladie de Chagas par immunoenzymologie. Rev. Franc. Transf. Immunohematol., V. 28, p. 201-213, 1985.

MATSUMOTO, T. K. *e cols.* High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas'disease. J. Microbiology, v. 31, n.6, p. 1486-1492, 1993.

MINTER-GOEDBLOED, E. *e cols.*. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemaculture in detectin of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infection. Trans. Roy. Soc. Med. Trop. Hyg., v. 72, n. 3, p. 217-225, 1978.

MOSER, R.D. e cols. . Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiology., V. 27, n. 7, p. 1477-1482, 1989.

MOURÃO, O.G.; MELLO, O.L. . Hemocultura para diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 9, p. 183-188, 1975.

NEAL, R.A.; MILES, R.A. . Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 12, p. 325-332, 1970.

NERY-GUIMARÃES, F. e cols. . Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, Leishmaniose tegumentares e calazar com vários抗ígenos de "Leishmania" e "Trypanosoma". Hospital, v. 75, p. 1811-1825, 1969.

NEVA, F. A.; GAM, A. A. A complement-fixing antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 26, n. 1, p. 37-46, 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Control de la enfermedad de Chagas: informe de um comité de expertos de la OMS. Série de Informes Técnicos, n.11, p. 42, 1991.

PEDREIRA DE FREITAS, J. L. . O diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. Rev. Clin. São Paulo, v. 28, p. 1-20, 1952.

PELLEGRINO, J.; BRENER, Z. a reação de fixação do complemento na doença de Chagas. III- observações sobre as propriedades da fração polissacarídica isolada de formas de cultura do *Schizotripanum cruzi*. Hospital, v. XLII, n. 4, p.115-121, 1952.

PERALTA, J. e cols. Serodiagnosis of Chagas'disease by enzyme -linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J. Clin. Microbiology, v. 32, p. 971-974, 1994.

PETRY, K., EISEN, H. . Chagas'disease: a model for the study of auto immune diseases. Parasitol. Today, v. 5, p. 111-121, 1989.

PIFANO, F.C. . El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase cronica. Estudo comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo e las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch Venez. Patol. Trop., V. 2, p. 89-100, 1954.

PRATA, A. . Classificação da infecção chagásica no homem. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 23, n. 2, p. 109-113, 1190.

PRIMAVERA, K. e cols. . Chagas'disease: IgA, IgM and IgG to *T. Cruzi*, amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 172-180, 1990.

RAMIREZ, L. E. O coelho como modelo experimental no estudo da doença de Chagas crônica. (Tese). Belo Horizonte(MG): 1984. 186 p.

ROCHA, A. e cols. . O teste imunoenzimático ELISA no líquido pericárdio: novo método para o diagnóstico “post-mortem” da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 20, n.4, p. 213-216, 1987.

ROMAÑA, C.; DIAS, E. . Reação de fixação no complemento em doença de Chagas com antígeno alcoólico de cultura do *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 37, p. 1-10, 1942.

RUSSOMANDO, G. e cols. . Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiology, v. 30, n. 11, p. 2864-2868, 1992.

SCHARFSTEIN, J. e cols. . Chagas'disease: serodiagnosis with purified GP 25 antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg., V. 34, n. 6, p. 1153-1160, 1985.

SCHECHTER e cols. . Prevalence of antibodies to 72-kilodalton glycoprotein (GP72) in patients with Chagas'disease and further evidence of zymodeme-associated expression of GP72 carbohydrate epitopes. Inf. Immunity, v. 53, n. 3, p. 547-552, 1986.

SEAH, S.; MARSDEN, P.D. . Complement ficaxation test in *Trypanosoma rhodesiense* infection with cultured *Trypanosoma cruzi* as antigen. Trans. R. Soc. Med. Hyg., V. 64, p. 279-283, 1970.

SILVA, I.G. e cols. . Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica ao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 26, n. 1, p. 19-24, 1993.

STROUT, R.G. A method for concentrating hemoflagellates. J. Parasitol., V. 48, p.100, 1962.

TEIXEIRA, R.L. e cols. . Inserção de DNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de célula hospedeira de mamíferos por meio de infecção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V. 24, n. 1, p. 55-58, 1991.

VOLLER, A. e cols. . A micro-plate enzyme-linked immunnosorbent assay (ELISA) for Chagas'disease. Lancet, v. 1, p. 426-429, 1975.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. . Chagas'disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISSBT Brazil'92, São Paulo, Brasil: 1992. 156 p.

WOO, P.T.K. . The hematocrit centrifugue for the detection of trypanosomes in blood. Can. Jour., Zoo., V. 47, p. 921-923, 1969.

WOO, P.T.K. . The hematocrit centrifugue techinique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Tropica, v. 27, p. 384-386, 1970.

WOO, P.T.K.. Evaluation of the hematocrit centrifuge techinique and other techinique for the field diagnosis of human trypanosomiases and filariasis. Acta Troica, v. 28, p. 298-303, 1971.

WOO, P.T.K.; HAWKIN, J.D. . Trypanosomes and experimental trypanosomiasis in east African bast. Acta Tropic, v. 32, p. 57-64, 1975.

WOO, P.T.K.; KAUFFMAN, M. . The hematocrit centrifugue techinique for the detection of low virulent strains of trypansomes of the *Trypanosoma congolense* subgroup. Acta Tropica, v. 28, p. 304-308, 1972

WOO, P.T.K.; ROGERS, D.J. . A statistical study of the sensitivity of the hematocrit centrifuge technique in the detection of trypansomes in blood. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg, v. 68, p. 319-326, 1974.

ZINGALES, B. e cols. . Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas'disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 85, n. 4, p. 519-522, 1990.

VIII-APÊNDICE

VII.1 - MEIO LIT (LIVER INFUSION TRYPOSE)

VII.1.1 - Reagentes

NaCl -----	4,0g
KCl -----	0,4g
Na ₂ HPO ₄ -----	8,0g
Glicose -----	2,0g
Triptose -----	5,0g
Infuso de Fígado -----	5,0g
Soro Bovino -----	100ml
Hemoglobina -----	20ml
H ₂ O destilada q.s.p. -----	1000ml

VII.1.2 - Técnica de Preparo

Dissolva os sais e triptose a frio e o infuso de fígado a quente. Em seguida reuna estas soluções e complete o volume para 800mL. Ajuste o pH para 7,2 - 7,4 com HCl 2N. Acrescente o soro bovino e deixe em banho-maria a 68°C por uma hora e com agitação constante. Deixe esfriar em banho de gelo e acrescente a hemoglobina, adicionando a seguir 500U de penicilina e 100µg de estreptomicina para cada mililitro de meio. Complete o volume para um litro com água destilada, clarifique em filtro 60S e esterilize em filtro 90S.

Faça uma prova de esterilidade com duração de sete dias e uma prova de crescimento utilizando um inóculo da cepa Y do *T. cruzi*, incubando a 28°C.

VII.2 - PBS - pH 7,2 - 7,4

VII.2.1 - Reagentes

SLN1	Na ₂ HPO ₄ -----	4,75g
	NaCl -----	5,00g
	H ₂ O destilada -----	1000mL

SLN2	{	KH ₂ PO ₄ -----	4,53g
		NaCl -----	5,00g
		H ₂ O destilada -----	1000ml

VII.2.2 - Técnica de Preparo

A solução de uso deste PBS é preparada misturando-se 800mL da SLN1 a 200mL da SLN2.

VII.3 - TRIPSINA - EDTA

VII.3.1 - Reagentes

NaCl -----	1,600g
KCl -----	0,080g
Glicose -----	0,200g
NaHCO ₃ -----	0,116g
EDTA -----	0,040g
Tripsina (Difco 1:250) -----	0,200g
Vermelho de Fenol 1% -----	90µl
Água Bidestilada q.s.p. -----	200mL

VII.3.2 - Técnicas de Preparo

Dissolva os sais, o EDTA, a glicose e a tripsina na água bidestilada. Acrescente vermelho de fenol e esterilize por filtração em membrana. Estoque a -20°C separando uma alíquota em que deve ser feita prova de esterilidade a 37°C, por um prazo mínimo de 24 horas.