UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós –Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da
doença de Chagas, em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5
anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil.**

Amanda Farage Frade

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

São Paulo/SP

2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós –Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da doença de Chagas, em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5 anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil.

Amanda Farage Frade

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

São Paulo/SP

2005

Amanda Farage Frade

APLICAÇÃO DO TESTE TESAcrúzi COMO CONFIRMATÓRIO PARA A
SOROLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS, EM AMOSTRAS DE SANGUE
DIGITAL DE CRIANÇAS DE 0 A 5 ANOS, COLHIDAS DE DIFERENTES
REGIÕES DO BRASIL.

Comissão Julgadora
Dissertação para o grau de Mestre

Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira
Orientador/ Presidente

Adelaide José Vaz

Maria Carmem A. Sanchez

São Paulo, 27 de junho de 2005.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia e Sorologia/ LIM 48
do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.

A Deus,
por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais,
Amadeu Macias Frade e Sarah Farage Frade por todo o apoio e sacrifício que fizeram para que meu sonho se tornasse realidade, por terem ensinado a enfrentar todos os obstáculos da vida com muita força, fé e esperança e por todo amor, incondicional.

Aos meus irmãos,
Amadeu e Amarah, pelo carinho, dividindo os momentos de alegria e os momentos de angústia, sempre me incentivando, mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Antônio Walter Ferreira por todo apoio, dedicação e incentivo que me ofereceu ao longo da orientação no mestrado, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, enfim, por ter acreditado neste trabalho.

A Dra. Marinete Martins Póvoa, Dr. Ricardo Dantas Machado e toda equipe do Instituto Evandro Chagas por ter iniciado o estímulo à pesquisa, mostrando caminhos novos a serem seguidos, e sem eles, sem dúvidas não teria chegado até aqui.

Aos meus pais e irmãos, por todo incentivo, por terem suportado juntos os momentos de stress e angustia com a finalização do trabalho, por sempre estarem ao meu lado, enfim, por tudo !!!

A Dra. Maria Carmem Sanchez e Dra. Guita Rubisnk Elefant por terem iniciado os ensinamentos no laboratório de sorologia com tanta dedicação, paciência e carinho.

A Dra. Sandra Moraes e Dra. Sandra Trevisan Beck que foram minhas verdadeiras mestras quando cheguei ao IMT, ensinando desde os passos mais básicos em um laboratório de pesquisa a execução das técnicas empregadas neste projeto, por todos os conselhos, por todo apoio, pela grande amizade.

Às amigas Mônica Eriko Kudó e Juliana Santos Coelho minhas irmãs de coração, por tudo que enfrentamos juntas no inicio da carreira profissional, quando chegamos em São Paulo, por sempre estar do meu lado nos momentos difíceis, por todo apoio e incentivo, pela paciência, conselhos, pelo carinho e eterna amizade, serei sempre grata a vocês...

Às meninas do laboratório de sorologia Érika Hellena Esther Hoffman, Kelly Aparecida Kanunfre e Fabiana Leoratti, formando uma grande equipe de trabalho, Patrícia Araújo, Janaína Miranda, por toda ajuda, seja na hora de executar as técnicas ou na procura de um artigo, sempre prestativas, pelo apoio, pela amizade, carinho e principalmente pela paciência que tiveram comigo nos últimos tempos, com a finalização do mestrado...

À Elaine Antunes Lemos, Zila Belém e toda equipe da BioMeriéux, pela disponibilidade aos recursos da empresa, pelo apoio, troca de informações que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aluisio Prata por disponibilizar as amostras para a realização deste trabalho e pelo apoio técnico e científico.

A equipe do laboratório do Prof. Dr. Paulo César Cotrim: Adriano Coelho Edite Sueli, Norival Kesper Jr., e a equipe do laboratório da Dra. Hiro Goto: Priante, Regiane, Edna Souza, Ângelo, Biatriz Celeste, Mussya Rocha, Érika Manuli, sempre estiveram presentes para esclarecer dúvidas, trocar informações, ou nos momentos de descontração da turma que ficava até mais tarde trabalhando no laboratório, verdadeiros companheiros de trabalho que se tornaram amigos.

A Dra. Eufrosina Umezawa e toda equipe do laboratório de protozoologia do IMT/SP por sempre deixar as portas abertas, por toda ajuda e permissão em utilizar toda matéria ou equipamento que fosse necessário para a realização deste trabalho.

A Fernanda Nunes, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelo carinho e amizade, por ter mostrado como é importante repassar os conhecimentos em frente.

A todos os funcionários do laboratório de Sorologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo: Paulo Oliveira, Arthur, Renato,

Eunice, Ione, as secretárias da diretoria, Vera e Jandira, pela colaboração e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários da biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção e auxílio, principalmente na finalização do trabalho.

Aos meus amigos da república Irmandade: Juliana e Daniele Coelho, Elton Curtis, Marica Makino e Mônica Kudó, por termos nos transformado em uma verdadeira família longe de nossas casas, pela paciência, por terem agüentado meus momentos mais difíceis no início dessa jornada, pelos momentos de alegria, pela amizade, e por todo carinho e incentivo, tudo isso que fez com que eu não desistisse nunca de meus objetivos.

As novas colegas de trabalho que se tornaram grandes amigas: Leda Talib e Isis Zainaghi, por todos os ensinamentos novos, pela imensa compreensão na falta de tempo devido a finalização do mestrado, por todos os conselhos, e pelo carinho como me receberam.

A todos meus amigos que não foram citados aqui, mas sem dúvidas estão cientes da minha eterna gratidão pelo apoio e incentivo.

Aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	19
1.	Doença de Chagas	20
1.1	Doença de Chagas Congênita	21
2.	Epidemiologia	23
3.	O agente etiológico: <i>T.cruzi</i>	26
4.	Estrutura antigênica do parasito	28
5.	Ciclo evolutivo	30
6.	Transmissão	31
7.	Aspectos clínicos	34
8.	Diagnóstico Clínico	36
9	Diagnóstico Laboratorial	36
9.1	Parasitológico	37
9.2	Molecular	38
9.3	Sorológico	39
10.	Pesquisa de Antígeno	44
II	JUSTIFICATIVA	45
III	OBJETIVOS	48
IV	MATERIAIS E MÉTODOS:	50
1.	Casuística	51
1.1	Amostras de sangue colhidas por punção digital em papel de filtro.	52
1.2	Amostras de sangue colhidas por via venosa	52
2	Aspectos éticos da pesquisa	52
3	Metodologia	53
3.1	Reação de Imunofluorescência Indireta – IFI	53
3.1.1	Amostras de soro	53
3.1.2	Amostras de sangue colhidas em papel de filtro.	53

3.2	Teste Imunoenzimático : ELISA	54
3.2.1	Amostras de soro	54
3.2.2	Amostras de sangue colhidas em papel de filtro	55
3.3	Western Blotting: Confirmatório da Infecção Chagásica.	55
3.3.1	Amostras de soro	55
3.3.2	Amostras de sangue colhidas em papel de filtro.	56
3.4	Análise estatística	56
V		58
	RESULTADOS	
1	Amostras de sangue eluídas de papel de filtro das crianças de 0 a 5 anos	59
1.1	Gerais - Brasil	59
1.2	Avaliação dos teste de Imunofluorescência indireta na sorologia da doença de Chagas em amostras de sangue colhidas em papel de filtro.	60
1.3	Avaliação do teste imunoenzimático ELISA na sorologia da doença de Chagas em amostras de sangue colhidas em papel e filtro.	66
1.4	Comparação entre os testes IFI e ELISA realizados no laboratório do IMT/SP.	71

1.5	Análises das amostras de sangue eluidas de papel de filtro reagentes no laboratório do IMT/SP:	74
1.6	Análise das amostras de sangue reagentes no TESAcruzi:	75
1.7	Sorologia Convencional x TESAcruzi	75
2	Amostras de soro de crianças e contactantes.	76
2.1	Análise dos resultados obtidos no teste de IFI nas amostras de soro.	78
2.2	Análise dos resultados obtidos no ELISA	79
2.3	Comparação entre os testes no laboratório do IMT/SP	80
VI	DISCUSSÃO	81
VII	CONCLUSÕES	91
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
VIII	ANEXOS	111
1	Termo de informação e consentimento	112
2	Fotos dos testes utilizados	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	31
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Antígenos expressos por <i>T.cruzi</i>	29
Tabela 2	Resultados obtidos nas amostras de eluatos, nos testes de IFI e ELISA nos laboratórios do IMT/SP e Goiânia, e no teste confirmatório TESAcruzi, no Brasil e nas diferentes regiões.	59
Tabela 3	Comparação dos resultados obtidos no laboratório do IMT/SP entre os testes de IFI e TESAcruzi .	63
Tabela 4	Comparação dos resultados obtidos nos laboratórios do IMT/SP e Goiânia no teste de IFI e seus índices de concordância.	65
Tabela 5	Comparação dos resultados obtidos no laboratório do IMT/SP entre os testes de ELISA e TESAcruzi .	68
Tabela 6	Comparação dos resultados obtidos nos laboratórios do IMT/SP e Goiânia no teste de ELISA e seus índices de concordância.	70
Tabela 7	Combinação binária da comparação entre os resultados obtidos nas amostras de eluatos nos testes convencionais IFI e ELISA no laboratório de IMT/SP e suas razões de concordância através do coeficiente Kappa.	73
Tabela 8	Resultados das amostras de eluatos reagentes no Brasil e regiões, nos testes IFI, ELISA e TESAcruzi suas diferentes titulações e D.Os encontradas no laboratório do IMT/SP.	74
Tabela 9	Comparação dos resultados obtidos no laboratório do IMT/SP nas amostras de eluatos reagentes pelo TESAcruzi com suas respectivas titulações e D.Os.	75
Tabela 10	Resultados das amostras de soros obtidos nos testes realizados no laboratório do IMT/SP.	77

Tabela 11	Relação entre as amostras de soros reagentes e suas diferentes titulações e D.Os encontradas no laboratório do IMT/SP.	78
Tabela 12	Combinação binária da análise dos resultados do laboratório do IMT/SP dos testes de IFI e Western Blotting nas amostras soros do Brasil e suas razões de concordância através do coeficiente Kappa.	79
Tabela 13	Combinação binária da análise do resultados do laboratório do IMT/SP dos testes de ELISA e Western Blotting nas amostras soro do Brasil e suas razões de concordância através do coeficiente Kappa.	80
Tabela 14	Combinação binária entre os resultados obtidos de eluatos entre os testes convencionais no laboratório do IMT/SP e suas razões de concordância através do coeficiente Kappa.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

D.O: densidade óptica

ELISA: “Enzyme Linked Immunisorbent Assay”

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

FUNEP: Fundação Nacional de Ensino e Pesquisa de Uberaba

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HÁ: Hemaglutinação

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

kDa: Quilodáltons

Nm: Nanômetros

OPD: Orto-fenil diaminobenzidina

PBS: “Phosphate buffer saline” solução salina tamponada

PBS-T: PBS contendo tween 20

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio

WB: Western blotting

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparação entre os resultados obtidos na sorologia convencional, no TESAcruzi na associação das duas metodologias convencionais.	76
-----------	---	----

RESUMO

Frade, A.F. – Aplicação do teste TESAcruzi como confirmatório para a sorologia da doença de Chagas em amostras de sangue digital de crianças de 0 a 5 anos, colhidas de diferentes regiões do Brasil . – São Paulo, 2005, 1v, 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A doença de Chagas ainda é causa importante da morte de milhares de pessoas nos países em desenvolvimento, sendo de grande importância a identificação e confirmação de indivíduos chagásicos, principalmente mulheres e crianças. Neste trabalho avaliamos o valor clínico dos resultados do teste sorológico TESAcruzi como confirmatório de infecção chagásica em amostras de sangue colhidas em papel de filtro . Foram estudadas 8.788 amostras de sangue coletadas em papel filtro (tipo Whatman nº4) de crianças de 0 a 5 anos de idade incompletos de zonas rurais de 13 estados do Brasil, enviadas ao Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelo Laboratório de Chagas do Hospital das Clínicas-UFG, para confirmação e controle de qualidade da infecção chagásica. Foram utilizados os testes sorológicos ELISA - BIOELISACRUZI, IFI - IMUNOCRUI e WB - TESAcruzi (BioMérieux-Brasil). Das 8.788 amostras de sangue analisadas, 166 (1,9%) foram reagentes por ELISA (cut off 0,3) e 313 (3,6%) por IFI a partir de 1/40. Todas as amostras reagentes ou duvidosas foram ensaiadas por TESAcruzi para confirmação dos resultados. Foram reagentes 77 eluatos (0,9%). Considerando que o TESAcruzi apresenta 100% de sensibilidade e 99,6% de especificidade, os valores preditivos positivos e negativos obtidos, conferem aos resultados um alto valor clínico para a confirmação de resultados positivos, negativos e inconclusivos na sorologia da doença de Chagas. A introdução do TESAcruzi na sorologia da doença de Chagas é uma ferramenta importante quando se deseja confirmar casos com sorologia duvidosa ou inconclusiva.

Palavras chave: Doença de Chagas, diagnóstico sorológico, Western blotting TESAcruzi.

ABSTRACT

Frade, A.F. - TESAcruzi: confirmatory test for Chagas disease diagnosis using serum samples collected by fingerprint, in filter paper, from children (0-5 years old) living in different states of Brazil – Sao Paulo, 2005, 1v, 112p. Master degree – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Identifying and confirming Chagas disease patients is a goal to be achieved at this moment, just when many countries from Latin America had announced its control and/or eradication. In this project we studied the TESAcruzi as confirmatory test for Chagas Disease diagnosis using serum samples collected from children (0-5 years old) living in different states of Brazil and selected by statistics criteria.

The study is part of the seroepidemiological survey that is occurring in Brazil looking for congenital or acquired Chagas disease. Blood samples collected by fingerprint in nº4 Whatman filter paper (10% of total and all reagents and inconclusive samples) were sent to our laboratory by central laboratory located in Goiania – Goiás to confirm previous results. For this we used traditional commercial reagents, IgG indirect immunofluorescence – IgG-IFI, enzyme immunoassay – IgG – ELISA and introduced TESAcruzi, western blotting reagent, recently registered by BioMerieux S.A. From 8.788 samples 166 (1.9%) were reagents in IgG-ELISA (C.O = 0.300) and 313 (3.64%) by IgG IFI (C.O 1/40). From these, 77 (0.9%) were reagents in TESAcruzi. Considering the predictive values of TESAcruzi (NPV = 100% and PPV = 99.5%) the results obtained had high clinical value to define the Chagasic patients.

TESAcruzi reagent seems to be an important tool for Chagas disease diagnosis when it is necessary to confirm reagents or inconclusive results.

Key-words: Chagas' disease, serological diagnosis, Western blotting, TESAcruzi