

**CELIA REGINA FURUCHO**

**Diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue:  
linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo  
epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas  
inconclusivas.**

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

**Área de concentração: Doenças Infecciosas  
e Parasitárias  
Orientadora: Profa. Maria Aparecida  
Shikanai Yasuda**

**SÃO PAULO  
2006**

Celia Regina Furucho

**Diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue:  
linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo epidemiológico em  
indivíduos com provas sorológicas inconclusivas**

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

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias  
Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

**São Paulo  
2006**

**AOS PACIENTES**

**Por todo carinho e altruísmo.**

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais,**

**Aos meus irmãos,**

**Ao Daniel,**

**À Cinthia,**

**À Tânia,**

**Obrigada por estarem sempre ao meu lado**

**Com carinho e amor verdadeiro.**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**À minha orientadora Maria Aparecida Shikanai Yasuda**

**Por todo carinho, compreensão, incentivo, dedicação e, sobretudo, pela paciência.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos companheiros de laboratório: Ana Carolina Mamana, Ana Carolina Mourão Roque, Aya Sadahiro, Bianca Cerretti, Claudia de Abreu Fonseca, Claudia Ubida, Constância Diogo Lima Lorente, Débora Bertossi, Érica Cano Passos, Edite Yamashiro Kanashiro, Eron Luis dos Santos, Evelyn Rodrigues, Guita Rubinsky Élefant, Jerenice Esdras Ferreira, Loraine Sangaletti, Marcello Magri, Márcia Andréia Ferreira, Márcia Yoshida, Maurício Galízia, Nídia Pinheiro, Paula Keiko Sato, Priscila Mayumi Kashiwabara, Priscilla Queiroz Garcia, Sueli Fátima de Bastos, Sueli Giordano Garcia, Tânia Heredia Maldonato, Telma Oshiro e Vera Lucia Teixeira de Freitas pelo companheirismo e apoio.

Ao Roberto Raiz Junior *in memoriam*, pela alegria e amizade.

A Dra. Maria Carmem Arroyo Sanches, pela amizade e valiosa contribuição nas análises estatísticas.

A Dra. Eufrozina Setsu Umezawa e ao Dr. Igor Correia de Almeida, pela orientação segura na realização das provas sorológicas.

Aos médicos do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias-FMUSP / Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias – HC-FMUSP pelo encaminhamento dos pacientes.

Ao Sr. José Maria Biazon e Dalva de Mello Ferreira pela agradável convivência durante minha permanência no serviço de coleta.

À D. Antonia, Natalina e à Judith, pela amizade e carinho.

Rosemeire Ribeiro e Roseli Santo, secretárias da Pós-Graduação, sempre prestativas nas informações e orientações dadas.

A todos que de alguma forma auxiliaram-me na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Investigação Médica-LIM 48, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| Resumo  |    |
| Summary   |    |
| 1. INTRODUÇÃO   | 02 |
| 2. OBJETIVOS  | 11 |
| 2.1. Objetivo geral   | 11 |
| 2.2. Objetivos específicos                                  | 11 |
| 3. MÉTODOS  | 13 |
| 3.1 Casuística  | 13 |
| 3.2 Critérios de inclusão                                   | 13 |
| 3.2.1. Grupo crônico  | 13 |
| 3.2.2. Grupo controle                                       | 13 |
| 3.2.3. Grupo inconclusivo                                   | 14 |
| 3.3 Questionário  | 14 |
| 3.4 Resultados das provas convencionais (IFI, HÁ, ELISA)    | 15 |
| 3.5 Coleta de sangue  | 15 |
| 3.6. Linfoproliferação                                      | 15 |
| 3.6.1. Preparação antigênica                                | 15 |
| 3.7. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico | 16 |
| 3.8. Teste de proliferação celular                          | 16 |
| 3.9. Provas sorológicas convencionais                       | 17 |
| 3.9.1. Imunofluorescência indireta (IFI)                    | 17 |
| 3.9.2. Hemaglutinação                                       | 17 |
| 3.9.3. ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)          | 17 |
| 3.9.4. TESA-blot  | 19 |
| 3.9.5. Reação de quimioluminescência                        | 20 |
| 3.9.6. ELISA – antígeno recombinante rk-39                  | 21 |
| 3.10. Provas parasitológicas                                | 22 |
| 3.10.1. Hemocultura   | 22 |



|   |    |
|---|----|
| 3.10.2. Xenodiagnóstico   | 23 |
| 3.11. Cálculo da sensibilidade e especificidade   | 23 |
| 3.12. Análise Estatística   | 24 |
| 4. RESULTADOS   | 27 |
| 4.1. Características dos grupos   | 27 |
| 4.1.1. Idade e sexo   | 27 |
| 4.1.2. Características epidemiológicas  | 27 |
| 4.2. Linfoproliferação frente a fitohemaglutinina e do antígeno de <i>Trypanosoma cruzi</i>                                     | 29 |
| 4.3. Curva ROC da linfoproliferação   | 31 |
| 4.4. Especificidade da resposta linfoproliferativa em pacientes com leishmaniose cutânea tratada                                | 32 |
| 4.5. Curva ROC das provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência e TESA-blot  | 33 |
| 4.6. Provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência de TESA-blot nos grupos crônico, inconclusivo e controle                 | 34 |
| 4.7. Concordância entre as provas EAE, TESA, quimioluminescência e TESA-blot nos grupos crônico, inconclusivo e controle        | 38 |
| 4.8. Resultados da linfoproliferação e provas sorológicas no grupo inconclusivo tendo como provas de referência:                | 39 |
| 4.8.1. Prova de referência: Linfoproliferação   | 39 |
| 4.8.1.1. Linfoproliferação com 5 µg/ml  | 39 |
| 4.8.1.2. Linfoproliferação com 10 µg/ml   | 40 |
| 4.8.2. Prova de referência: TESA-blot   | 41 |
| 4.8.3. Prova de referência quimioluminescência  | 42 |
| 4.9. Resultados das provas sorológicas convencionais e as provas: linfoproliferação, EAE, TESA, TESA-blot no grupo inconclusivo | 43 |
| 4.10. Provas parasitológicas nos grupos crônico e inconclusivo  | 43 |
| 4.11. Comparação entre positividade das provas sorológicas em pacientes do grupo crônico com parasitemia positiva e negativa    | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 4.12. Análise das amostras com duas ou mais provas sorológicas positivas e três ou mais parâmetros positivos no grupo inconclusivo | 46 |
| 4.12.1. Presença de duas ou mais provas sorológicas positivas  | 46 |
| 4.12.2. Presença de um a sete parâmetros positivos às provas sorológicas, linfoproliferação, parasitemia e dados epidemiológicos   | 47 |
| 5. Discussão   | 51 |
| 6. Conclusões  | 59 |
| 7. Referências bibliográficas  | 63 |
| 8. Anexos  | 73 |
| Anexo A  | 74 |
| Anexo 1  | 76 |
| Anexo 2  | 78 |
| Anexo 3  | 80 |

## RESUMO

Tendo como objetivos, avaliar a contribuição da resposta celular e provas sorológicas de alto desempenho em pacientes com provas sorológicas convencionais inconclusivas para doença de Chagas: imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação (HA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram analisados 60 pacientes na fase crônica da doença de Chagas, 73 indivíduos com provas sorológicas convencionais inconclusivas e, 43 indivíduos aparentemente saudáveis, sem antecedentes prévios de contacto com triatomíneos ou familiares com doença de Chagas e com provas de IFI e HA negativas. Foram realizadas as provas: ELISA com extrato alcalino de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), ELISA com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, quimioluminescência com glicoconjugado de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, hemocultura, xenodiagnóstico e linfoproliferação com 5 e 10 µg/ml de antígeno de *T. cruzi*. No grupo crônico, 80%, 83,3% e 85% dos pacientes foram positivos à linfoproliferação com 5, 10 µg/ml e 5 e/ou 10 µg/ml, no grupo inconclusivo, 17,8%, 19,2% e 20,5% foram, respectivamente, positivos. TESA-blot apresentou 100% de sensibilidade e especificidade nos grupos crônico e controle, respectivamente e, no grupo inconclusivo, 15 amostras de 73 foram positivas. As provas parasitológicas foram positivas em 18,9% no grupo crônico e 1,3% no grupo inconclusivo. Considerando-se como parâmetros as 4 provas sorológicas, 1 parasitológica (xenodiagnóstico e/ou hemocultura), linfoproliferação (5 µg/ml e/ou 10 µg/ml) e antecedentes epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas (contato com barbeiro e/ou familiares com doença de Chagas e/ou ter morado em casa de barro, taipa, pau-a pique), mostrou-se que o diagnóstico de doença de Chagas é provável com a presença de 3 ou mais parâmetros positivos ou 2 ou mais provas sorológicas positivas, com destaque para a prova TESA-blot positiva em 100%. A linfoproliferação pode representar uma prova de apoio quando as provas sorológicas convencionais resultarem negativas ou inconclusivas, particularmente na vigência de parâmetros epidemiológicos sugestivos de doença de Chagas.

## SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the contribution of cellular response, and high performance serological tests in patients with inconclusive conventional serological tests: indirect immunofluorescence (IFI), hemagglutination assay (HA), enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA). Sixty patients in the chronic phase of Chagas disease were analyzed, 73 individuals with inconclusive conventional serological tests and, 43 healthy individuals, without previous contact with triatominae, or presence of relatives with Chagas disease, and negatives IFI e HA. The following tests were carried out: ELISA with alkaline extract from epimastigotes forms from *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), ELISA with antigens of excretion and secretion of trypomastigote form from *T. cruzi*, chemiluminescent ELISA test with purified trypomastigote glycoconjugate, hemoculture, xenodiagnosis and lymphoproliferation with 5 and 10 µg/ml of *T. cruzi* antigen. The chronic group, 80% and 83,3% of patients were positive to lymphoproliferation with 5 and 10 µg/ml, and in inconclusive group 17,8% and 19,2% were positive respectively. TESA-blot showed 100% of sensitivity and specificity in chronic group, and in inconclusive group, 15 samples of 73 were positive. Parasitological tests were positive in 18,9% in chronic group, and 1,3% in inconclusive group. Considering 4 serological tests as parameters, 1 parasitological (xenodiagnostic and/or hemoculture), lymphoproliferation (5 µg/ml and/or 10 µg/ml), and epidemiological data (contact with triatominae and/or relatives with Chagas disease and/or to have lived in an adobe house), showed that the presence of 3 or more positive parameters, or 2 or more positive serological tests is suggestive of Chagas disease with prominence to TESA-blot test. Lymphoproliferation can represent a support test when conventional serological tests were negative or inconclusive, particularly in the presence of epidemiological data suggestive of Chagas disease.

# **Introdução**

## 1. Introdução

A doença de Chagas é uma das moléstias de mais ampla distribuição no continente americano. Estima-se que 16-18 milhões de pessoas estejam infectadas e que aproximadamente 120 milhões de pessoas vivam em áreas de risco na América Latina (WHO, 2002), além disso, a doença de Chagas tem sua importância documentada pela morbidade e mortalidade, representada por elevado número de óbitos ao ano (5.355) em relação a outras doenças emergentes (Silveira *et al.*, 2000).

À medida que a transmissão por *Triatoma infestans* foi controlada em todo território nacional, com exceção de focos nos estados de Tocantins e Bahia (Silveira *et al.*, 2000) ocorreu mudança do perfil epidemiológico da doença de Chagas graças à grande migração do campo para as grandes cidades, assumindo importância outras vias de contaminação tais como a transfusional, congênita, por transplante de órgãos e por acidentes laboratoriais (Dias *et al.*, 2000). Deve-se ressaltar o grande risco de contaminação de aproximadamente 20% (WHO, 2002) ao se receber uma bolsa de sangue infectada.

Considerando 1.494.032 amostras coletas em hemocentros de todo o Brasil, uma prevalência média anual de 0,9% de doadores de sangue rejeitados (13.383) por provas sorológicas de triagem reativas a antígenos de *T. cruzi* foi registrada em 1998 (Ministério da Saúde, 1998). Mais recentemente, os dados referentes aos hemocentros públicos mostram que a taxa de rejeição dos doadores apenas na entrevista clínica é de cerca de 22% (Ministério da Saúde, 1998); sendo 12,5% rejeitados posteriormente pela triagem sorológica, 0,9% apenas pela doença de Chagas.

A Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo descartou, no período de 1993 e 1994, cerca de 6.936 bolsas de sangue (1,68%) por serem reativas a pelo menos um dos três testes empregados (Salles *et al.*, 1996), sendo 0,5% reativas às três provas empregadas para doença de Chagas. Em 2001, na mesma instituição, foram submetidas a testes confirmatórios 9.942 amostras reativas; e tais índices foram 1,14% reativas a pelo menos um dos testes e 0,14% de candidatos doadores com provas sorológicas positivas para doença de Chagas (Salles *et al.*, 2003). No ano de 2002, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a taxa de inaptidão sorológica brasileira para a doença de Chagas era de 0,61%, em bancos de sangue. No ano de 2005, Wendel em sua tese de doutorado, estudando 13.383 amostras de soro em laboratório de referência verificou que a prevalência da infecção por *T. cruzi* em candidatos a doadores de sangue no Brasil foi de cerca de 0,49%.

Diante de tais mudanças, a resolução RDC N° 153, anexo VIII-A de 14 de junho de 2004 (ANVISA), estabeleceu que a triagem para a doença de Chagas deverá ser realizada por apenas um teste imunoenzimático de alta sensibilidade.

Um dos grandes desafios hoje em bancos de sangue é reduzir tanto o número de bolsas descartadas indevidamente como também os custos para liberação de bolsas de sangue, com o valor de cada unidade em torno de US\$ 60.00 (Carvalho *et al.*, 1993). Para tal, é fundamental o emprego de provas acuradas que permitam elucidar o diagnóstico da doença de Chagas e conseqüentemente, amenizar o desgaste emocional a que o doador é submetido quando as provas sorológicas convencionais resultarem inconclusivas.

Os métodos sorológicos constituem-se no alicerce do diagnóstico da doença de Chagas crônica devido a boa sensibilidade e especificidade, pois os níveis de anticorpos são demonstráveis décadas após a infecção (Vattuone *et al.*, 1973; Kirchhoff *et al.*, 1993). Embora a sensibilidade seja boa nas provas sorológicas convencionais (IFI, HA e ELISA) com antígenos de formas epimastigotas, a reatividade cruzada com outras doenças, principalmente leishmaniose, prejudica a especificidade (Camargo *et al.*, 1974; Chiller *et al.*, 1990; Velasquez *et al.*, 1993). Dessa forma, um número relativamente grande de resultados pode ser caracterizado como indeterminado ou inconclusivo (Salles *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 1990) em candidatos a doadores de sangue, pela discordância entre os resultados das provas convencionais, inclusive após várias repetições.

A imunofluorescência indireta, utilizando formas epimastigotas de *T. cruzi*, (Camargo & Souza, 1966), continua sendo um teste de grande valia, sendo considerada reação de referência quando a leitura é feita por pessoal devidamente treinado e equipado, uma desvantagem é o tempo gasto na leitura das lâminas. Por outro lado, a hemaglutinação indireta constitui-se em teste de fácil execução não necessitando de equipamento nem pessoal qualificado para interpretação dos resultados, mas possui baixa sensibilidade (Leiby *et al.*, 2000).

Dessa forma, provas altamente sensíveis e de elevada especificidade poderiam ter valor no diagnóstico dos pacientes com provas sorológicas inconclusivas. Entre as reações imunoenzimáticas, é muito utilizado como antígeno o extrato alcalino derivado de formas epimastigotas, de sensibilidade elevada na fase crônica, porém de menor especificidade que os antígenos de formas tripomastigota (Umezawa *et al.*, 1996).



Na reação de quimioluminescência, mostrou-se melhor desempenho de mucina de formas tripomastigotas em relação às formas epimastigotas, com 100% de índices de sensibilidade e especificidade em amostras de soros de pacientes com doença de Chagas com hemocultura e/ou xenodiagnóstico positivo e cerca de 12,2% de positividade em amostras de soros com provas sorológicas convencionais inconclusivas (Almeida *et al.*, 1997). Embora o emprego da técnica necessite de equipamento de custo elevado, deve-se considerar sua vantagem de aplicação à rotina com mínimas quantidades de soro, diminuindo assim o risco de reações cruzadas com outras doenças.

Moléculas recombinantes e peptídeos sintéticos têm sido testados em ensaios imunoenzimáticos com diferentes graus de eficiência. Vergara *et al.*, 1992 observaram cerca de 98% de positividade em chagásicos para um ou mais de cinco peptídeos sintéticos clonados do antígeno de *T. cruzi*; Ferreira *et al.*, 2001 observaram para quatro peptídeos sintéticos 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade, enquanto Peralta *et al.*, 1994 detectaram para dois peptídeos sensibilidade de 99,4% e especificidade de 98,0%. Similares índices foram registrados com antígenos recombinantes (Zingales *et al.*, 1993, Paranhos-Bacalla *et al.*, 1994; Peralta *et al.*, 1994; Godsel *et al.*, 1995, Krautz *et al.*, 1995, Umezawa *et al.*, 1999). Observou-se por ELISA com misturas de antígenos recombinantes (CRA-FRA) (Krieger *et al.*, 1992), 98% sensibilidade e 100% de especificidade. O emprego de antígeno recombinante FcaBP por Godsel *et al.*, 1995 permitiu observar 100% de sensibilidade e especificidade; com seis antígenos recombinantes H49, JL7, A13, B13, JL 8 e IF8, a sensibilidade variou de 79 a 100% e a especificidade de 96,2 a 99,6% (Umezawa *et al.*, 1999), com melhor desempenho isolado de IF8 (sensibilidade de 99% e especificidade de 99,6%). A utilização dessas

provas em campo em larga escala, os custos para sua produção e seu papel no seguimento durante e após terapêutica específica ainda não foram avaliados.

Outra estratégia para o aumento da especificidade é o emprego da reação de imunoblot com antígenos secretados e excretados de formas tripomastigotas (TESA) (Umezawa *et al.*, 1996) com altos índices de sensibilidade e especificidade. Em amostras de soros de doadores de sangue com provas sorológicas inconclusivas, observou-se 2,87% de positividade, com sensibilidade e especificidade de 100% em pacientes com doença de Chagas e não chagásicos (Silveira-Lacerda *et al.*, 2004). Esta prova tem como desvantagem custo elevado, cerca de US\$ 20.00 por teste e a necessidade de manipulação de formas tripomastigotas para a obtenção do antígeno TESA.

Adicionalmente, a pesquisa de antígenos na urina (antigenúria) foi descrita por Umezawa *et al.*, 1993, que encontraram sensibilidade de 60% em pacientes crônicos, enquanto que Corral *et al.*, 1996, observaram cerca de 100% de positividade com anticorpos monoclonais em ensaios de ELISA de captura em pacientes na fase aguda, congênita e crônica, esta última com xenodiagnóstico positivo.

Os métodos parasitológicos são considerados padrão-ouro, porém, mesmo os exames indiretos com enriquecimento do parasito, têm baixa sensibilidade, cerca de 30 a 50% na fase crônica da doença, mesmo após várias repetições (Chiari *et al.*, 1989). Embora altamente específicos, estes métodos laboriosos podem levar semanas até a sua conclusão, tornando-se impraticáveis na rotina de bancos de sangue, mas sendo úteis como padrão-ouro na prática clínica para o diagnóstico e controle pós-terapêutico, particularmente na confirmação de parasitemia.

A introdução de técnicas moleculares no diagnóstico da doença de Chagas crônica trouxe expectativas de que a sensibilidade na detecção do parasito viesse a responder várias questões relativas ao diagnóstico e ao controle de cura, assim como elucidar dúvidas referentes à patogenia da moléstia. Vários aprimoramentos foram introduzidos facilitando o emprego de técnicas em campo por meio da coleta de sangue em guanidina-HCl, o sistema “hot start” e fervura (Britto *et al.*, 1995; Wincker *et al.*, 1994), registrando-se inicialmente elevada positividade na detecção do parasito, cerca de 90-95%, em contraste com 43% de sensibilidade do xenodiagnóstico (Britto *et al.*, 1993). No entanto, a validação em campo da mesma técnica permitiu observar que a sensibilidade de detecção nem sempre é elevada, variando segundo as regiões de procedência dos pacientes. Desta forma, ao lado de sensibilidade de 96,5% em Minas Gerais (Wincker *et al.*, 1994), sensibilidade de 45% em pacientes chagásicos foi descrita na Paraíba (Britto *et al.*, 1995; Coura *et al.*, 1996) e de 59,5% no Piauí (Coura *et al.*, 1996). Em função dos dados já relatados, houve considerável diminuição do entusiasmo para aplicação da PCR como ferramenta útil ao diagnóstico em bancos de sangue.

Técnicas de PCR aplicadas ao diagnóstico em pacientes com provas sorológicas inconclusivas têm registrado resultados positivos que variam de 4,3 a 46,2% segundo Ribeiro dos Santos *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 1999 e de 43,3% de positividade usando o nested-PCR segundo Marcon *et al.*, 2002, exigindo cuidados redobrados para se evitar contaminação. Em função da maior sensibilidade dos métodos moleculares, a automação da reação e o uso da PCR em tempo real podem ser de valor no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas convencionais inconclusivas.

Provas parasitológicas mesmo com baixos índices de sensibilidade vêm sendo utilizadas como referência por se constituírem em prova indubitável de doença. Embora, altamente específicas, essas provas não são indicadas para bancos de sangue por serem laboriosas e por necessitarem de longos períodos, até 90 dias, para a finalização da técnica. Em episódios de infecção recente, a sensibilidade das provas parasitológicas aumenta significativamente, sendo referência de fase aguda da doença; em episódios de co-infecção Chagas-HIV na fase crônica da doença de Chagas, a reativação é caracterizada pelo encontro do parasito no sangue circulante (Sartori, 2001).

O reconhecimento de antígenos de *T. cruzi* por linfócitos de pacientes chagásicos tem sido empregado para estudo da imunidade celular sem finalidade diagnóstica (Tschudi *et al.*, 1972; Gomes *et al.*, 1999). Assim, 5-30% dos linfócitos de pacientes chagásicos reconhecem antígenos de *T. cruzi* por técnicas de linfoproliferação (Tschudi *et al.*, 1972), por outro lado, pacientes chagásicos crônicos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas apresentam níveis maiores de resposta citotóxica a antígeno de formas epimastigotas: cardiopatas assintomáticos apresentam maiores níveis de ativação citotóxica do que pacientes com a forma indeterminada e cardiopatas sintomáticos sendo tal atividade neutralizada por interferon- $\gamma$  (Barros-Mazon *et al.*, 1997).

A importância da resposta imune celular em humanos foi atestada em episódios de imunossupressão, em transplante de órgão e quimioterapia citotóxica (neoplasias) e em indivíduos com co-infecção *T. cruzi*/HIV, em que há grave acometimento do sistema nervoso central e de outros órgãos.

Adicionalmente, o emprego de provas cutâneas de hipersensibilidade tardia com antígenos de *T. cruzi* foi proposto para o diagnóstico da doença de Chagas (Teixeira *et al.*, 1978), sendo que tal inoculação de antígenos do parasito não resultou em exarcebação de uma resposta celular expressa por citotoxicidade.

Permanecem, pois, como incógnitas e com perspectivas a serem esclarecidas na doença de Chagas se a resposta imune celular pode contribuir no diagnóstico de indivíduos com provas sorológicas inconclusivas.

Propõe-se no presente trabalho, o estudo de provas de imunidade celular associadamente a provas sorológicas de elevada sensibilidade e especificidade para verificar seu papel no diagnóstico da doença de Chagas crônica, quando as provas sorológicas convencionais forem inconclusivas.

# **OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a contribuição da resposta celular e das provas sorológicas anti-frações antigênicas específicas de *T. cruzi* no diagnóstico da doença de Chagas em pacientes com provas sorológicas inconclusivas para doença de Chagas.

### **2.2. Objetivo específico**

Comparar o reconhecimento de antígenos do parasito por linfoproliferação aos resultados de TESA-blot e quimioluminescência com antígenos de formas tripomastigotas.

# MÉTODOS



### **3. Métodos**

#### **3.1. Casuística**

Foram analisadas 176 amostras de indivíduos divididos em 3 grupos segundo critérios de inclusão a seguir descritos. Apenas uma amostra por paciente/indivíduo foi incluída.

#### **3.2. Critérios de inclusão**

##### **3.2.1. Grupo crônico, como controle positivo**

Sessenta pacientes na fase crônica da doença de Chagas provenientes do Ambulatório da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP com presença de dois ou três resultados positivos em três provas sorológicas convencionais para a doença de Chagas: imunofluorescência indireta,  $\geq 1/40$  (IFI), hemaglutinação indireta,  $\geq 1/40$  (HA) e ensaio imunoenzimático (ELISA), realizados na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

##### **3.2.2. Grupo controle, como controle negativo**

Quarenta e três indivíduos voluntários, aparentemente saudáveis, escolhidos por não terem antecedentes de contacto prévio com triatomíneos e/ou de familiares com doença de Chagas, e com três provas sorológicas convencionais negativas (IFI, HA e ELISA com antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi*).

### **3.2.3. Grupo inconclusivo**

Setenta e três indivíduos encaminhados pela Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo que apresentaram provas sorológicas convencionais inconclusivas por ocasião da doação de sangue:

- a) Uma prova positiva em três ou uma positiva e uma duvidosa em três ou uma a três provas duvidosas em três, uma positiva e duas duvidosas em três;
- b) Em dois momentos diferentes: resultados ora próximos ao limiar de reatividade, ora negativos ou duvidosos.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento pós-informação, sendo garantido sigilo sobre sua identificação. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.3. Questionário**

Foi aplicado um questionário (anexo) a respeito dos dados epidemiológicos: naturalidade, migrações, presença de barbeiro na casa ou vizinhança, relato de picada por triatomíneo, doença de Chagas na mãe ou em outros familiares, história de transfusão de sangue e derivados, tipo de moradia: sapé, pau-a-pique, madeira, barro, alvenaria.

### **3.4. Resultados das provas convencionais (IFI, HA e ELISA)**

Foi considerada positiva a amostra com títulos  $\geq 1/40$  nas provas IFI e HA; os resultados da prova ELISA foram considerados segundo critérios estabelecidos pelo fabricante.

### **3.5. Coleta de sangue**

Foram coletadas as seguintes amostras de sangue da veia cubital:

- 10 ml de sangue em tubo estéril com heparina sódica (Roche) para o ensaio de linfoproliferação, que foi utilizado imediatamente para a realização da prova.
- 10 ml de sangue em tubo seco para obtenção de soro para as provas sorológicas, que foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em alíquotas com e sem glicerina (v/v) até o momento do uso;
- 30 ml de sangue em tubo estéril com heparina sódica (Roche) para a hemocultura;
- 10 ml de sangue em tubo estéril com heparina sódica (Roche) para o xenodiagnóstico.

### **3.6. Linfoproliferação**

#### **3.6.1. Preparação antigênica**

O estímulo foi feito a partir de antígeno total de *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 1978) gentilmente cedido pelo Dr. Antonio R. L. Teixeira (Universidade de Brasília).

As concentrações ótimas do antígeno, foram de 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , quantificação feita pelo método de Lowry, 1951.

### **3.7. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

As amostras de sangue foram depositadas suavemente sobre gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) e centrifugadas a 1300  $g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Incibrás Spin VI). Ao final da centrifugação foi coletada, com pipeta do tipo Pasteur. A camada formada entre o Ficoll-Hypaque ( $\delta=1,077$ ) e o plasma corresponde às células mononucleares, segundo Boyum, 1968. Procedeu-se a lavagens das células com meio de cultura RPMI centrifugando a 1000 $g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . As células foram ajustadas para  $2 \times 10^6/\text{ml}$ , observando-se a viabilidade por azul de tripano (Merck) de no mínimo 90% para a realização da prova. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com L-glutamina e 10% de “pool” soro humano AB, Rh+, inativado a  $56^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8. Teste de proliferação celular**

O cultivo foi feito em placas de fundo chato com 96 cavidades (Corning) em triplicatas,  $2 \times 10^5$  células e antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi* segundo Teixeira *et al.*, 1978 (5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) ou fitohemaglutinina (PHA) (Difco, Detroit, MI). O cultivo foi mantido por 144 horas frente aos antígenos do parasito e por 72 horas frente a PHA (Difco, Detroit, MI) em ambiente úmido de 5% de  $\text{CO}_2$ . Cerca de 8 horas antes do término deste período foram acrescentados 2  $\mu\text{Ci}$  de timidina triciada (Radiochemical Centre, Amersham Life Science, United Kingdom) com atividade de 74 GBq/mmol,

2Ci/mmol. As células foram aspiradas através de um papel de filtro com auxílio de coletor automático de células (Cell harvester). Ao papel de filtro contendo células radioativas foi acrescido líquido de cintilação (Wallac – EG&G Co.) e, tendo sido a radioatividade incorporada determinada em aparelho Wallac – EG&G Co. Os resultados foram expressos em desintegrações por minuto (cpm) e obtidos para diferença entre cpm das células estimuladas e não-estimuladas ( $\Delta$  cpm).

### **3.9. Provas sorológicas convencionais**

#### **3.9.1. Imunofluorescência indireta (IFI)**

A prova foi realizada no grupo controle segundo instruções do fabricante, Biolab Mérieux lote H5030301.

#### **3.9.2. Hemaglutinação (HA)**

A prova foi realizada no grupo controle segundo instruções do fabricante, Biolab Mérieux lote 21267.

#### **3.9.3. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

A prova EAE foi realizada com extrato alcalino de formas epimastigotas e TESA com antígeno de secreção e excreção de formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, segundo Umezawa *et al.*, 2001.

O antígeno TESA foi obtido segundo Umezawa *et al.*, 2001, com modificações. Brevemente, o sobrenadante de cultura de células LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com formas

tripomastigotas por 5 dias foi centrifugado a 2,800g por 10 minutos a 4°C, filtrado em membrana de acetado com porosidade de 0,22 µm (Millipore) e utilizado imediatamente ou estocado a -70°C.

Foram utilizadas microplacas de fundo chato com 96 cavidades (Costar, Hybond-polyestirene plates, Cambridge, MA).

ELISA EAE: as placas foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno diluído a 1:500 em tampão carbonato-bicarbonato por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

TESA-ELISA: as placas foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno diluído a 1:80 em tampão carbonato-bicarbonato por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

O bloqueio foi feito com 100 µl/cavidade de PBS Tween20 a 0,05% Leite Molico<sup>®</sup> 5% por 30 minutos à temperatura ambiente.

Soros humanos foram diluídos a 1:200 em PBS contendo Tween20 0,05% (PBS-T) leite Molico<sup>®</sup> 1% e foram incubados 50 µl/cavidade por 1 hora a 37 °C em câmara úmida.

Anticorpos anti IgG-humana marcados com peroxidase (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA), foram diluídos a 1:3000 em PBS e foram incubados 50 µl/cavidade por 1 hora a 37°C em câmara úmida.

Após a incubação de cada etapa, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T.

A revelação dos imune-complexos foi feita pela adição de 50 µl/cavidade contendo: 5 mg de OPD (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA), 12,5 ml de tampão

citrato 0,05M pH 5,0 (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) e 7 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Merck) e incubadas por 30 minutos a 37 °C na ausência de luz.

A reação foi interrompida com a adição de 25 µl/cavidade de HCl 4N (Merck).

A Leitura foi feita em 492 nm (Labsystems Multiskan MS).

#### **3.9.4. TESA-blot, segundo Umezawa *et al.*, 1996.**

Esta prova foi realizada no Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sob orientação de Eufrozina Setsu Umezawa.

Foram adicionados 150 µl do antígeno TESA e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (Mini-Protean II; BioRad). Os antígenos eletroforicamente separados foram transferidos segundo Towbin *et al.*, 1979 (Mini-Protean II, BioRad) para uma membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm (BioRad) em sistema semi-seco (Hoefer-Scientific Instruments) por 1 hora.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS Tween20 a 0,05% leite Molico® 5% por 30 minutos.

Soro humano diluído a 1:200 em PBS-T leite Molico® 1% foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente e os anticorpos detectados pela adição de anti-IgG humana feita em cabra marcada com peroxidase (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) diluída a 1:2000 em PBS-T leite Molico® 1% por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente.

A revelação dos imune-complexos foi feita pela adição de 600 µl contendo: 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Merck), 6 mg de 4-cloro1-naftol (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) diluído em 2 ml de metanol (Merck) e 10 ml de PBS.

A reação foi suspensa pela adição de água deionizada.

### **3.9.5. Reação de quimioluminescência**, segundo Almeida *et al.*, 1997.

A prova de quimioluminescência foi realizada no Laboratório de Glicobiologia, do Depto. de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob orientação do professor Igor de Almeida.

O antígeno preparado segundo Almeida *et al.*, 1996, brevemente, a partir de cerca de  $2 \times 10^{10}$  parasitos liofilizados obtidos de cultura de células LLCMK<sub>2</sub> infectadas com formas tripomastigotas da cepa Y, obtidas de 5 a 8 dias de cultura segundo Andrews *et al.*, 1982. Brevemente, é realizada a delipidação com clorofórmio-metanol (Merck) sob agitação por 1 minuto, remover o sobrenadante e repetir o processo por mais duas vezes. Secar o sedimento com nitrogênio líquido. Adicionar 10 vezes o volume de butanol a 9% (Merck) ao sedimento seco. Deixar sob agitação constante por 4 horas a temperatura ambiente ou durante 18 horas a 4°C. Centrifugar a 1000g a temperatura ambiente por 15 minutos, desprezar o sobrenadante. Repetir o procedimento por mais duas vezes. Armazenar o sedimento a -20°C. Após a homogeneização em acetato de amônia (Merck) e propanol (Merck), a solução é processada em coluna de Octyl-Sepharose CL 4B (Amersham) e a presença de proteínas dos picos coletados foi atestada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 40%, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli, 1970 e posterior coloração pelo método da prata.



O antígeno diluído a 1:2000 em solução tampão carbonato 0,06M pH 9,6 foi imobilizado em placas opacas brancas de 96 cavidades (Nunc, Roskilde, Denmark) por 18 horas a 4°C. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS-T albumina bovina fração V (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) 0,1% por 30 minutos a 37°C.

As placas foram incubadas com soro humano diluído a 1:2000 em PBS-T por 30 minutos e anti-IgG humana biotinizada (Amersham) diluída a 1:2000 em PBS-T por 30 minutos a 37°C e depois com estreptoavidina marcada com peroxidase (Amersham) diluído a 1:1000 em PBS-T por 30 minutos a 37°C. A reação foi desenvolvida com luminol (ECL, Amersham) diluído a 1:20 em tampão carbonato 0,06M pH 9,6.

Os resultados foram avaliados a partir de unidades relativas de luminescência (RLU's) em luminômetro (Modelo 7710, Cambridge Technology Watertown, MA).

### **3.9.6. ELISA – antígeno recombinante rK-39**

O antígeno rK-39 foi obtido segundo Burns *et al.*, 1993 e foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira.

Cerca de 100 ng do antígeno foi fixado às placas de poliestireno de fundo plano (NUNC “polysorp high binding”) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6 peroxidase (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) e incubadas por 18 horas a temperatura ambiente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com PBS-T albumina bovina fração V (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) 1% por 30 minutos. Para conservação das placas, foram mantidas por 6 horas a 40 °C, e estocadas em embalagens individuais de alumínio, seladas e preservadas a 4 °C até o momento do uso.

As placas foram incubadas com amostras de soros diluídas a 1:200 em solução diluente de soro e albumina bovina fração V (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) a 1% em PBS, 100 µl/cavidade e incubadas por 1 hora a 37°C.

Anti-IgG-humana obtida em carneiro, marcada com peroxidase (Biolab-Mèrieux) diluído a 1:15.000, lote SP 990502 em solução contendo soro albumina bovina fração V (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) 1% e tampão fosfato, 100 µl/cavidade, por uma hora a 37 °C. A cada etapa de incubação foram feitas cinco lavagens com PBS em lavadora de microplaca (BIOTEK Instruments inconclusivo. ELX 50/12).

A atividade enzimática foi revelada com TMB (Sigma Chemical Sto. Louis, Mo, USA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Intergene), incubado na ausência de luz por quinze minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl por cavidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Merck). A leitura foi feita a 450 nm (Diagnostics Pasteur LP 300).

### **3.10. Provas parasitológicas**

#### **3.10.1.Hemocultura**

Esta prova foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Parasitologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com Luz *et al.*, 1994.

Cerca de 30 ml de sangue periférico foram coletados com heparina sódica (Roche), tendo sido o plasma removido por centrifugação durante 10 minutos a 1.000g a 4 °C e o sedimento lavado com meio LIT (Liver Infusion Tryptose). O meio LIT foi acrescentado ao sedimento e essa suspensão distribuída em seis tubos que foram

incubados a 28 °C, com leitura de cada tubo ao microscópio representada pelo número de tubos positivos/total tubos analisados segundo Luz *et al.*, 1994, aos 30, 60 e 90 dias.

### **3.10.2. Xenodiagnóstico “in vitro”**

Realizado a partir de 10 ml de sangue coletado com heparina sódica (Roche). No laboratório, o sangue é colocado em um recipiente coberto com filme transparente (Parafilm “M”<sup>®</sup>), aquecido a 37 °C e oferecido para alimentação a 40 ninfas de *Triatoma infestans* de terceiro ou quarto estadio de durante 40 minutos. Trinta e 60 dias após o repasto sangüíneo, o conteúdo intestinal de cada triatomíneo, obtido por compressão abdominal, foi analisado separadamente, à microscopia direta, para pesquisa de *T. cruzi*, a leitura individual do xenodiagnóstico permitiu a semi-quantificação de parasitemia através da proporção: número de ninfas infectadas/número de ninfas avaliadas, segundo Borges Pereira *et al.*, 1989.

### **3.11. Cálculo da sensibilidade e especificidade**

A Curva ROC (receiver operating characteristic) descreve quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico (Martinez *et al.*, 2003) constituindo-se em ferramenta útil ferramenta para medir e especificar problemas no desempenho de um teste diagnóstico. Esta análise por meio de um método gráfico permite estabelecer o ponto de corte otimizando a sensibilidade e especificidade. A área abaixo da curva ROC está associada ao poder discriminante de um teste de diagnóstico. O teste ideal é aquele que alcança a extremidade mais superior e à esquerda do gráfico. As coordenadas

deste gráfico representam medidas de probabilidade e, por conseguinte sendo perfeito o teste que alcança valor um. A curva ROC permite o encontro do ponto ideal para se cálculos de sensibilidade e especificidade e foi aplicada às provas de linfoproliferação, EAE, TESA e QUI.

### **3.12. Análise Estatística**

Foram utilizados os programas Sigma Stat (Jandel Scientific) versão 1.0, Microsoft Excel e Prisma 3.0. Para comparação entre as proporções de resultados negativos e positivos nas provas: TESA-blot, provas parasitológicas, dados epidemiológicos e relação positividade de parâmetros e testes foi utilizado o teste exato de Fisher e a comparação entre dois grupos pelo teste T.

A análise entre os grupos crônico, inconclusivo e controle nas provas linfoproliferação, EAE, TESA e QUI foi feita pelo método de Kruskal-Wallis e a detecção dos grupos diferentes pelo método de Dunn.

A análise entre os grupos com parasitemia positiva e negativa foi feita pelo método de Mann Whitney.

Para avaliar o grau de concordância entre os resultados das provas estudadas, utilizou-se o índice de kappa de Cohen, este último, podendo assumir valores considerados como concordância (Dawson, 2003).

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| $k \leq 0,2$ | ausência de concordância |
| 0,01- 0,2    | pequena concordância     |
| 0,21-0,4     | discreta concordância    |
| 0,41-0,6     | concordância regular     |
| 0,61-0,8     | boa concordância         |
| 0,81-0,92    | muito boa concordância   |
| 0,93-1,0     | excelente concordância   |

Considerou-se um nível de significância de 5%, aceitando um erro tipo I de 5% (alfa=0,05).

# **RESULTADOS**

## 4. Resultados

### 4.1 – Características dos grupos

#### 4.1.1 – Idade e sexo

Conforme se vê à Tabela 1, as medianas das idades nos grupos crônico, inconclusivo e controle foram: 35, 45 e 30 anos. Houve predomínio de indivíduos do sexo masculino no grupo inconclusivo (71,8%) e predomínio do sexo feminino nos grupos crônico e normal, 60,3% e 55,8% respectivamente, conforme mostrado à Tabela 1.

A análise estatística mostrou não haver homogeneidade entre os grupos quanto aos dados idade e sexo.

Tabela 1. Mediana da idade e distribuição por sexo nos grupos crônico  $n=58$ , inconclusivo  $n=71$  e controle  $n=43$ .

| Idade (anos)/sexo | crônico ( $n=58$ ) | inconclusivo ( $n=71$ ) | controle ( $n=43$ ) |
|-------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|
| Mínima-máxima     | 25-62              | 19-67                   | 18-76               |
| Mediana           | 35                 | 45                      | 30                  |
| Sexo masculino    | 39,6%              | 71,8%                   | 44,2%               |

#### 4.1.2. Características epidemiológicas

A distribuição das variáveis epidemiológicas (presença do barbeiro em casa ou na vizinhança, presença de picada pelo barbeiro, tipo de casa (sapé, adobe, barro), presença de mãe ou algum familiar com a doença de Chagas) segundo os grupos, encontra-se representada à Figura 1. No grupo crônico, relatos de presença de barbeiro em casa ou na vizinhança, se foi picado por barbeiro e presença de familiares com doença de Chagas, ocorreram em 57,1%, 17% e 43,8% e em 34,2%, 4,1% e 15,5% no grupo

inconclusivo, respectivamente. Nenhum paciente do grupo controle apresentou qualquer antecedente epidemiológico positivo.

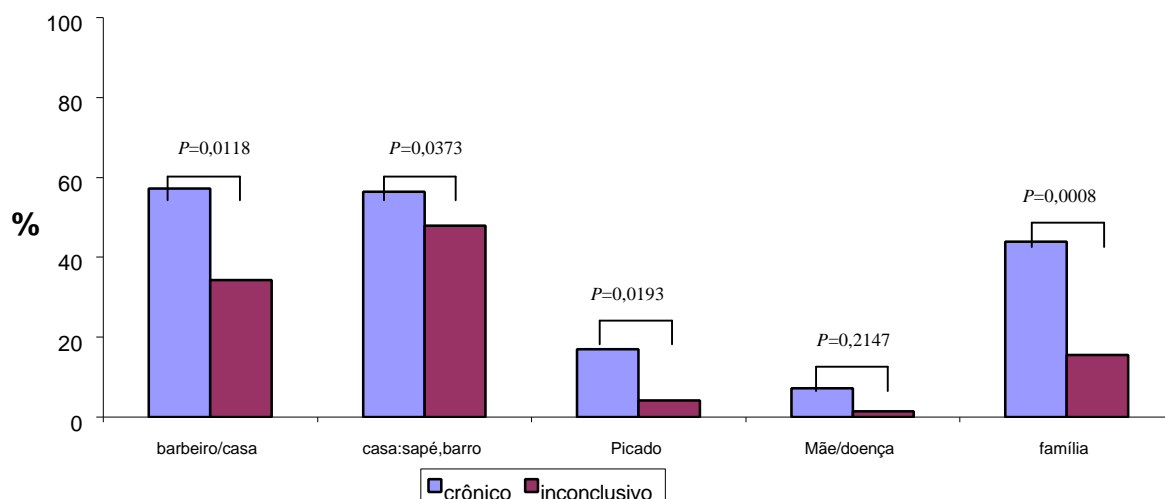


Figura 1. Frequência das características epidemiológicas dos grupos: crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e controle ( $n=43$ ). A diferença entre as porcentagens dos grupos crônico e inconclusivo foi avaliada pelo teste  $\chi^2$  ( $p$ ).

A análise estatística das características epidemiológicas nos grupos crônico e inconclusivo mostrou haver diferenças significantes quanto à presença de barbeiro na vizinhança e/ou a frequência de relato da picada pelo barbeiro ou presença de familiares (mãe e/ou familiares) com a doença de Chagas que foram consideradas como antecedentes epidemiológicos sugestivos de doença de Chagas. Quanto ao tipo de moradia (casa de barro, sapé, taipa, pau-a-pique, madeira), houve também diferença entre esses dois grupos.

Verificou-se também diferença estatisticamente significante entre os grupos crônico, inconclusivo e controle quando as regiões de procedência (Grande São Paulo, interior de São Paulo, Nordeste, Sudeste, Sul, Norte e outros) foram analisadas ( $p<0,0001$ ).



## 4.2 Linfoproliferação frente a fitohemaglutinina e ao antígeno de *Trypanosoma cruzi*

A Figura 2 mostra resultados similares de linfoproliferação frente à fitohemaglutinina para os 3 grupos, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

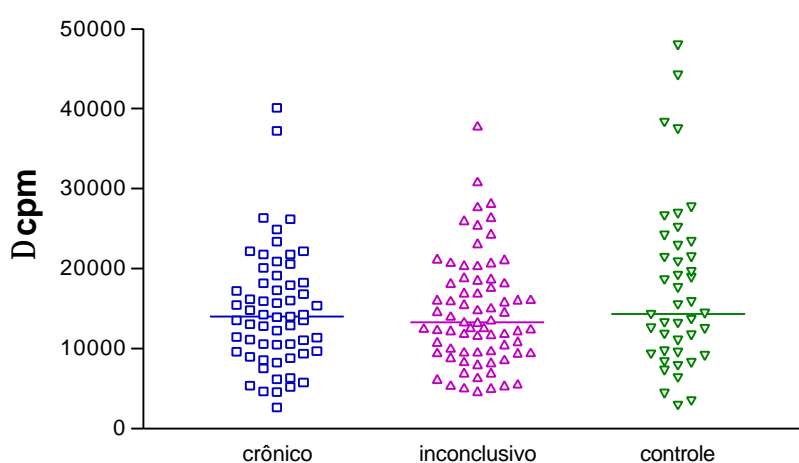


Figura 2. Resultados de linfoproliferação em ? cpm frente à fitohemaglutinina segundo os grupos crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e controle ( $n=43$ ). A linha representa a mediana dos valores. A comparação entre os três grupos revelou  $p=0,4739$  (Kruskal-Wallis).

Conforme se vê às Figuras 3 e 4, indivíduos do grupo crônico apresentaram resposta linfoproliferativa a antígenos de *T. cruzi* mais elevada em relação aos grupos inconclusivo e controle.

Os resultados da linfoproliferação frente a 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno foram similares, não havendo diferença estatisticamente significativa no grupo crônico. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os grupos crônico e controle, crônico e inconclusivo, respectivamente, tanto com 5 como 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno (Figuras 3 e 4).

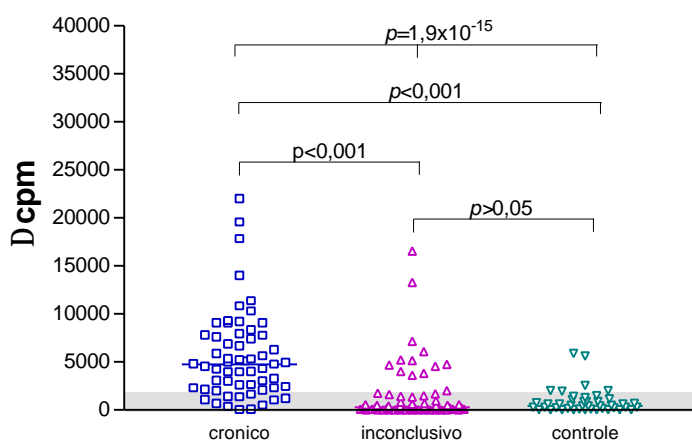


Figura 3. Resultados de linfoproliferação em ? cpm frente a 5 µg/ml de antígeno nos grupos crônico,  $n=60$ , inconclusivo,  $n=73$  e controle,  $n=43$ . A linha representa a mediana dos valores de cada grupo e a área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade. A comparação entre os três grupos revelou  $p=1,9 \times 10^{-15}$  (Kruskal-Wallis). Detecção de diferença entre os grupos pelo método de Dunn.  
? cpm = cpm estimulado - cpm não estimulado

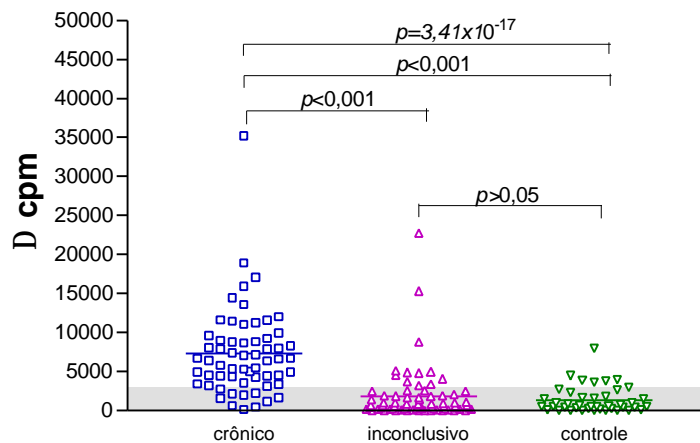


Figura 4.  
Resultados de linfoprolife

ração em ? cpm frente a 10 µg/ml de antígeno nos grupos crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e controle ( $n=43$ ). A linha representa a mediana dos valores de cada grupo e a área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade. A comparação entre os três grupos revelou  $p=3,41 \times 10^{-17}$  (Kruskal-Wallis). Detecção de diferença entre os grupos pelo método de Dunn.

? cpm = cpm estimulado - cpm não-estimulado

#### 4.3. Curva ROC da linfoproliferação

O limiar de reatividade do ensaio de linfoproliferação foi calculado através da curva ROC, aplicada a 103 amostras, sendo 60 de pacientes com doença de Chagas e 43 de indivíduos controle, definindo-se 2.000 cpm como o limiar de reatividade em ? cpm para o cálculo de sensibilidade e especificidade frente a 5 µg/ml de antígeno e 3.000 cpm como limiar de reatividade para os ensaios com 10 µg/ml.

A positividade no grupo crônico foi de 80% e 83,3% frente a 5 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente. No grupo controle, cerca de 9,3% dos indivíduos responderam a 5 µg/ml de antígeno e 13,9% a 10µg/ml (Tabelas 2 e 3). No grupo inconclusivo, cerca de 17,8% (13/73) e 16,4% (12/73) de pacientes no grupo de inconclusivo apresentaram ? cpm acima do limiar de reatividade frente a 5 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, e 20,5% (15 de 73) frente a 5 e/ou 10 µg/ml.

Tabela 2. Parâmetros de desempenho da linfoproliferação, frente a 5 µg/ml de antígeno segundo o limiar de reatividade empregando os grupos crônico (n=60) e grupo controle (n=43).

| Parâmetros                | Limiar de reatividade – 5 µg/ml |             |             |
|---------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|
|                           | ≥ 1.500 cpm                     | ≥ 2.000 cpm | ≥ 2.500 cpm |
| Sensibilidade             | 83,3%                           | 80,0%       | 71,7%       |
| Especificidade            | 86,0%                           | 90,7%       | 93,0%       |
| Eficiência                | 84,6%                           | 85,3%       | 80,6%       |
| Valor Preditivo Positivo* | 89,3%                           | 92,3%       | 93,5%       |
| Valor Preditivo Negativo* | 78,7%                           | 76,5%       | 70,2%       |

\* Prevalência de 1,3%, segundo Akhavan, 1996

Tabela 3. Parâmetros de desempenho da linfoproliferação frente a 10 µg/ml de antígeno segundo o limiar de reatividade empregando os grupo crônico ( $n=60$ ) e grupo controle ( $n=43$ ).

| Parâmetros                | Limiar de reatividade – 10 µg/ml |             |             |
|---------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|
|                           | ≥ 2.500 cpm                      | ≥ 3.000 cpm | ≥ 3.500 cpm |
| Sensibilidade             | 85,0%                            | 83,3%       | 65,0%       |
| Especificidade            | 79,1%                            | 86,1%       | 86,0%       |
| Eficiência                | 82,0%                            | 84,5%       | 75,5%       |
| Valor Preditivo Positivo* | 85,0%                            | 89,3%       | 57,5%       |
| Valor Preditivo Negativo* | 79,1%                            | 78,7%       | 65,8%       |

\* Prevalência de 1,3%, segundo Akhavan, 1996

#### 4.4. Especificidade da resposta linfoproliferativa em pacientes com leishmaniose cutânea tratada

A especificidade da resposta linfoproliferativa foi também avaliada em oito pacientes com leishmaniose cutânea tratada, não se observando linfoproliferação positiva em resposta ao antígeno, como demonstrado à Figura 5.

Considerando 43 indivíduos do grupo controle e oito pacientes com leishmaniose ( $n=51$ ), a especificidade da linfoproliferação frente a 5 µg/ml de antígeno (limiar de reatividade  $\geq 2.000$  cpm) e 10 µg/ml (limiar de reatividade  $\geq 3.000$  cpm) foi de respectivamente 92,1 % e 88,2 %.

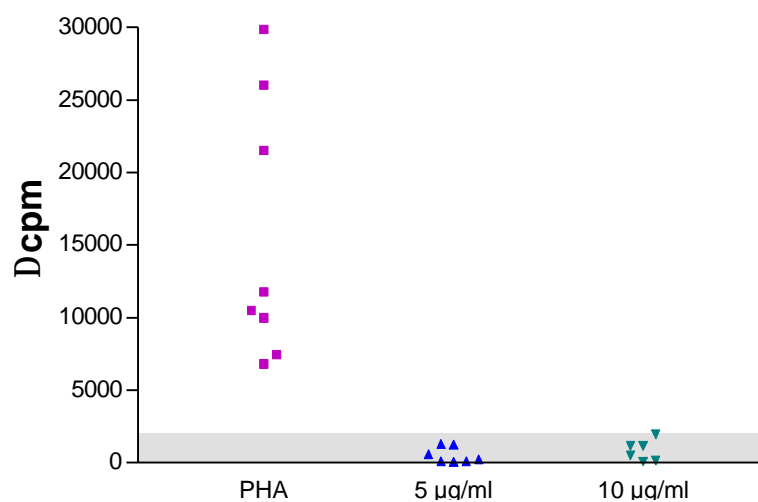


Figura 5. Distribuição de oito pacientes com leishmaniose cutânea tratada segundo resultados da linfoproliferação (com) frente a 5 e 10 µg/ml de antígeno.  
 ? cpm = cpm estimulado - cpm não-estimulado

#### 4.5. Curva ROC das provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência e TESA-blot

O limiar de reatividade das provas sorológicas foi calculado através da curva ROC, aplicada a 103 amostras de soro, sendo 60 pacientes com doença de Chagas e 43 indivíduos controle, definindo-se o valor de 0,2 de densidade ótica como limiar de reatividade para o cálculo de sensibilidade e especificidade para as provas EAE e QUI e, de 0,3 para TESA como mostrado à Tabela 4.

Tabela 4. Características das provas sorológicas ELISA com extrato alcalino de formas epimastigotas do *T.cruzi* (EAE), ELISA com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA), quimioluminescência com glicoconjugado de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (QUI) e imunoblot com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA-blot) nos grupos crônico ( $n=60$ ) e grupo controle ( $n=43$ ), segundo o limiar de reatividade.

| Características           | Limiar de reatividade |              |              |           |
|---------------------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------|
|                           | EAE                   | TESA         | QUI          | TESA-blot |
|                           | $\geq 0,200$          | $\geq 0,300$ | $\geq 0,200$ | + ou -    |
| Sensibilidade             | 98,3%                 | 96,7%        | 98,3%        | 100%      |
| Especificidade            | 100%                  | 100%         | 100%         | 100%      |
| Eficiência                | 99,1%                 | 98,3%        | 99,1%        | 100%      |
| Valor Preditivo Positivo* | 100%                  | 100%         | 100%         | 100%      |
| Valor Preditivo Negativo* | 99,9%                 | 99,9%        | 99,9%        | 100%      |

\*Prevalência de 1,3%, segundo Akhavan, 1996.

#### 4.6. Provas sorológicas EAE, TESA, QUI e TESA-blot nos grupos: crônico, inconclusivo e controle

Conforme se vê à Tabela 5, destaca-se o elevado valor de positividade da prova TESA-blot (100%) no grupo crônico e 100% de resultados negativos no grupo controle. No grupo inconclusivo, 20,5% ( $n=15$ ) das amostras foram positivas por esta prova.

No grupo inconclusivo, a maior porcentagem de resultados positivos encontrada na prova TESA-blot, foi seguida em ordem decrescente de positividade nas provas QUI, TESA e EAE, respectivamente.

Tabela 5. Distribuição de indivíduos ( $n+$ ) e frequência (%) de positividade às provas ELISA com extrato alcalino de formas epimastigotas de *T. cruzi* (EAE), ELISA com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA), quimioluminescência com glicoconjugado de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (QUI) e imunoblot com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA-blot) e linfoproliferação com 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (linfo) nos grupos crônico ( $n=60$ ) inconclusivo ( $n=73$ ) e grupo controle ( $n=43$ ).

| Grupos<br>$n$               | EAE<br>% ( $n+$ )  | TESA<br>% ( $n+$ ) | QUI<br>% ( $n+$ )  | TESA-<br>blot<br>% ( $n+$ ) | Linfo<br>5 $\mu\text{g/ml}$<br>% ( $n+$ ) | Linfo<br>10 $\mu\text{g/ml}$<br>% ( $n+$ ) | Linfo 5<br>e/ou<br>10 $\mu\text{g/ml}$<br>% ( $n+$ ) |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---|--|--|
| Crônico<br>( $n=60$ )       | 98,3%<br>$n+$ (59) | 96,7%<br>$n+$ (58) | 98,3%<br>$n+$ (1)  | 100%<br>$n+$ (60)           | 80%<br>$n+$ (48)                          | 83,3%<br>$n+$ (50)                         | 85%<br>$n+$ (51)                                     |
| Inconclusivo<br>( $n=73$ )  | 15,0%<br>$n+$ (11) | 12,3%<br>$n+$ (9)  | 19,2%<br>$n+$ (14) | 20,5%<br>$n+$ (15)          | 17,8%<br>$n+$ (13)                        | 16,4%<br>$n+$ (12)                         | 20,5%<br>$n+$ (15)                                   |
| Controle<br>( $n=43$ )      | 0                  | 0                  | 0                  | 0                           | 9,3%<br>$n+$ (4)                          | 13,9%<br>$n+$ (6)                          | 18,6%<br>$n+$ (8)                                    |
| $n = n^\circ$ de indivíduos |                    |                    |                    |                             |   |  |  |

Observa-se à Tabela 5 a distribuição de resultados nos três grupos quanto à presença de anticorpos detectáveis por EAE, TESA, QUI e % de amostras positivas por TESA-blot. Houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos nas provas sorológicas EAE, TESA, QUI em nível  $p < 0,001$  pelo método de Kruskal-Wallis. Houve diferença estatística para tais provas entre os grupos crônico-inconclusivo e

crônico-controle e entre o grupo inconclusivo-controle em nível de  $p < 0,05$  pelo método de Dunn (Figuras 6 e 7).

A comparação entre a % de amostras positivas por TESA-blot nos três grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) pelo método de  $\chi^2$ ; houve diferença entre os grupos crônico e inconclusivo e crônico e controle, em nível de  $p < 0,0001$  e entre inconclusivo-controle em nível de  $p = 0,0037$ .

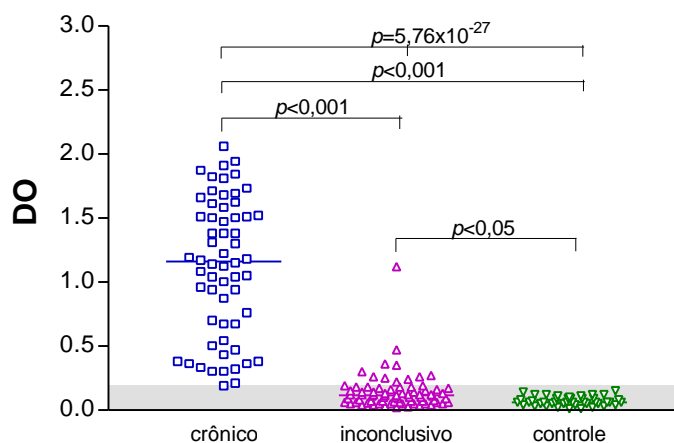


Figura 6. Distribuição dos níveis de anticorpos à prova EAE utilizando antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi* no grupo crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e grupo controle ( $n=43$ ). A linha representa a mediana dos valores e a área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade. A análise entre os grupos revelou  $p = 5,76 \times 10^{-27}$  (Kruskal-Wallis). Detecção da diferença entre os grupos pelo método de Dunn.



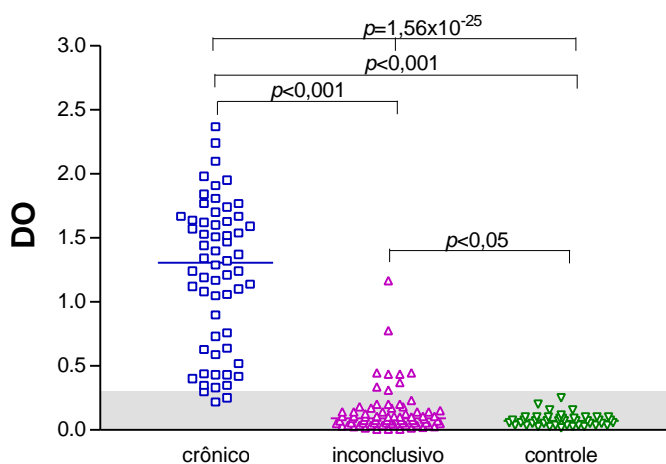


Figura 7. Distribuição dos níveis de anticorpos à prova TESA utilizando antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* nos grupos crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e controle ( $n=43$ ). A linha representa a mediana dos valores e a área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade. A análise entre os grupos revelou  $p=1,56 \times 10^{-25}$  (Kruskall-Wallis). Detecção da diferença entre os grupos pelo método de Dunn.

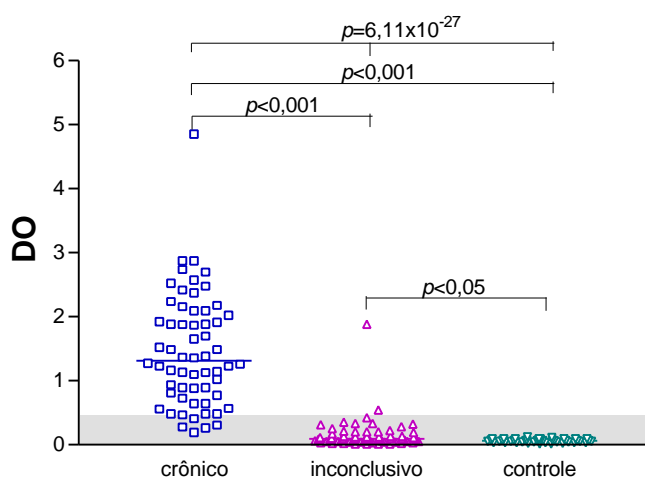


Figura 8. Distribuição dos níveis de anticorpos à prova de quimioluminescência nos grupos crônico ( $n=60$ ), inconclusivo ( $n=73$ ) e controle ( $n=43$ ). A linha representa a mediana dos valores e a área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade. A análise entre os grupos revelou  $p=6,11 \times 10^{-27}$  (Kruskall-Wallis). Detecção da diferença entre os grupos os grupos pelo método de Dunn.

#### 4.7. Concordância entre as provas EAE, TESA, QUI e TESA-blot nos grupos crônico, inconclusivo e controle

O índice  $\kappa$ appa mostrou maior concordância entre as provas TESA-blot, EAE, TESA e quimioluminescência, de 0,98 para os grupos crônico e controle (Tabela 6). No grupo inconclusivo, observou-se índice  $\kappa$ appa de 0,776 para as provas de linfoproliferação entre 5  $\mu\text{g/ml}$  e 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno; de 0,613 entre TESA-blot e linfoproliferação 5  $\mu\text{g/ml}$  e de 0,667 entre TESA-blot e linfoproliferação 10  $\mu\text{g/ml}$ , conforme mostrado à Tabela 7.

Tabela 6. Índice de concordância  $\kappa$ appa entre as provas ELISA com extrato alcalino de formas epimastigotas de *T. cruzi* (EAE), ELISA com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA), quimioluminescência com glicoconjugado de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (QUI) e imunoblot com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA-blot) e linfoproliferação com 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (linfo) nos grupos crônico ( $n=60$ ) e grupo controle ( $n=43$ ).

| Prova                     | TESA-blot | TESA | EAE  | QUI  | Linfo 5 $\mu\text{g/ml}$ | Linfo 10 $\mu\text{g/ml}$ |
|---------------------------|-----------|------|------|------|--------------------------|---------------------------|
| <b>TESA-blot</b>          | 1,00      |      |      |      |                          |                           |
| TESA                      | 0,96      | 1,00 |      |      |                          |                           |
| EAE                       | 0,98      | 0,98 | 1,00 |      |                          |                           |
| QUI                       | 0,98      | 0,94 | 0,96 | 1,00 |                          |                           |
| Linfo 5 $\mu\text{g/ml}$  | 0,69      | 0,65 | 0,67 | 0,67 | 1,00                     |                           |
| Linfo 10 $\mu\text{g/ml}$ | 0,60      | 0,64 | 0,66 | 0,66 | 0,79                     | 1,00                      |

Tabela 7. Índice de concordância  $\kappa$ appa entre as provas ELISA com extrato alcalino de formas epimastigotas de *T. cruzi* (EAE), ELISA com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA), quimioluminescência com glicoconjugado de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (QUI) e imunoblot com antígenos de excreção e secreção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TESA-blot) e linfoproliferação com 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (linfo) no grupo inconclusivo ( $n=73$ ).

| Prova                            | TESA-blot | TESA   | EAE   | QUI   | Linfo 5 $\mu\text{g/ml}$ | Linfo 10 $\mu\text{g/ml}$ | Linfo 5 e/ou 10 $\mu\text{g/ml}$ |
|----------------------------------|-----------|--------|-------|-------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| TESA-blot                        | 1,00      |        |       |       |                          |                           |                                  |
| TESA                             | 0,448     | 1,00   |       |       |                          |                           |                                  |
| EAE                              | 0,533     | 0,277  | 1,00  |       |                          |                           |                                  |
| QUI                              | 0,500     | 0,323  | 0,165 | 1,00  |                          |                           |                                  |
| Linfo 5 $\mu\text{g/ml}$         | 0,613     | -0,455 | 0,344 | 0,283 | 1,00                     |                           |                                  |
| Linfo 10 $\mu\text{g/ml}$        | 0,667     | -0,588 | 0,389 | 0,323 | 0,776                    | 1,00                      |                                  |
| Linfo 5 e/ou 10 $\mu\text{g/ml}$ | 0,580     | 0,310  | 0,441 | 0,269 | 0,957                    | 0,957                     | 1,00                             |

#### 4.8. Resultados da linfoproliferação e provas sorológicas no grupo inconclusivo tendo como prova de referência:

##### 4.8.1. Prova de referência: Linfoproliferação

##### 4.8.1.1. Linfoproliferação com 5 $\mu\text{g/ml}$

Como se vê à Figura 9, nas quais estão representados os 13 indivíduos com linfoproliferação positiva (5  $\mu\text{g/ml}$ ) e os resultados das outras provas realizadas, observa-se maior número de resultados positivos, à semelhança do maior índice kappa observado à Tabela 7 entre tais reações em 73 indivíduos do grupo inconclusivo.

Verifica-se que a prova TESA-blot positiva sempre esteve em concordância com os resultados de linfoproliferação positivos com 5  $\mu\text{g/ml}$  no grupo inconclusivo, conforme mostrado ao Anexo 1.

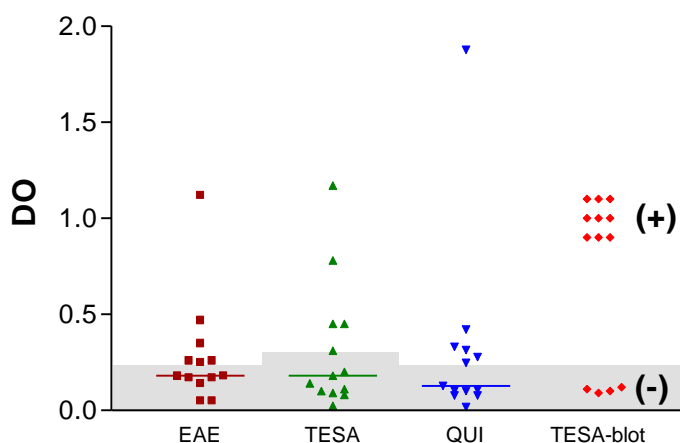


Figura 9. Distribuição de treze indivíduos do grupo inconclusivo com linfoproliferação positiva frente a 5  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno segundo resultados de provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência e TESA-blot. A linha representa a mediana dos valores. A área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade.

#### 4.8.1.2. Linfoproliferação com 10 $\mu\text{g/ml}$

A Figura 10 mostra os doze indivíduos do grupo inconclusivo com TESA-blot positivo com a distribuição de outras provas realizadas.

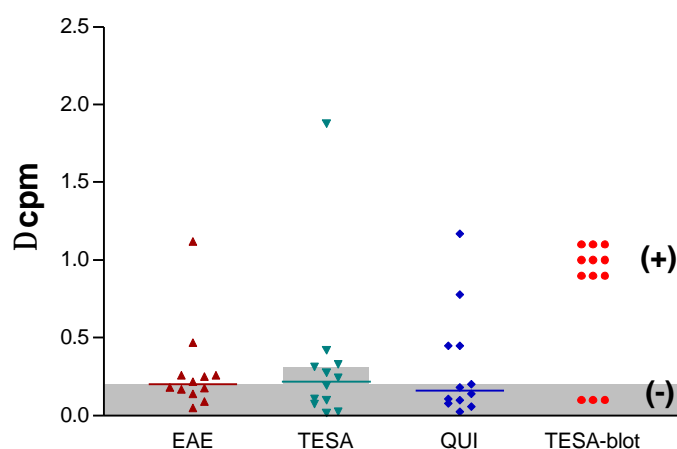


Figura 10. Distribuição de doze indivíduos do grupo inconclusivo com linfoproliferação positiva frente a 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno no grupo inconclusivo, segundo provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência (QUI) e TESA-blot. A linha representa a mediana dos valores. A área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade.

#### 4.8.2. Prova de referência: TESA-blot

Dos quinze pacientes com TESA-blot positivo, onze apresentaram a prova de quimioluminescência positiva, nove EAE positivo e linfoproliferação positiva com 5 e com 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno e, 8 apresentaram TESA positiva, como se vê ao Anexo 1.

Excluindo os quinze pacientes com TESA-blot positivo, mais sete tiveram provas sorológicas positivas (Anexo 1), sendo três só quimioluminescência, três EAE e um paciente só TESA positivo. Desses sete, apenas quatro têm antecedentes epidemiológicos de doença de Chagas (dois EAE, um TESA e um QUI).

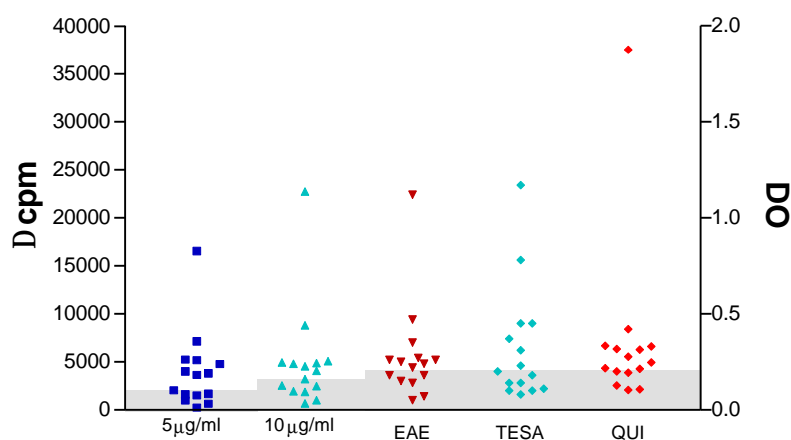


Figura 11. Prova TESA-blot positiva no grupo inconclusivo, segundo linfoproliferação frente a 5 e 10 µg/ml de antígeno e provas sorológicas EAE, TESA, quimioluminescência (QUI),  $n=15$ . A área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade.

#### 4.8.3. Prova de referência: Quimioluminescência

A Figura 12 mostra os quatorze pacientes com reação de quimioluminescência positiva e os resultados das outras provas (Anexo 1).

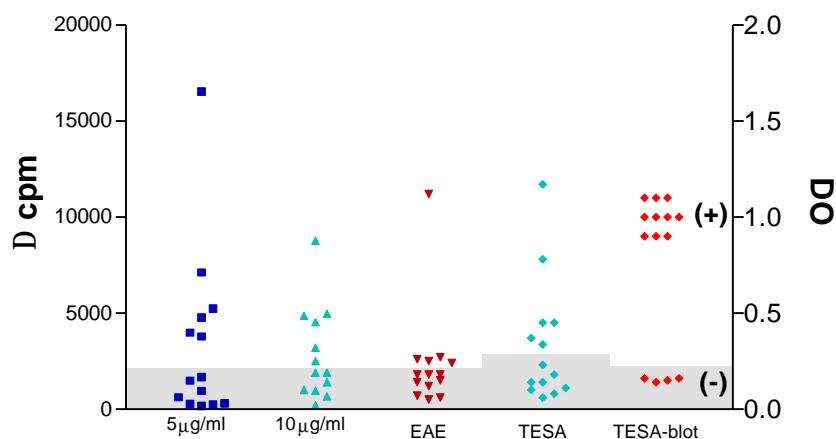


Figura 12. Distribuição de quatorze pacientes com reação de quimioluminescência positiva do grupo inconclusivo segundo, resultados de linfoproliferação frente a 5 e 10 µg/ml de antígeno, EAE, TESA e TESA-blot. A área destacada na cor cinza representa a região dos valores abaixo do limiar de reatividade.

#### **4.9. Resultados das provas sorológicas convencionais e as provas: linfoproliferação, EAE, TESA, QUI e TESA-blot no grupo inconclusivo**

A comparação no grupo inconclusivo entre os resultados observados por provas sorológicas convencionais realizadas antes da inclusão e os testes realizados no presente trabalho (linfoproliferação, EAE, TESA, QUI e TESA-blot) mostraram grau de concordância de no máximo 0,273 entre HA e EAE.

#### **4.10. Provas parasitológicas nos grupos crônico e inconclusivo**

No grupo crônico, onze amostras foram positivas às provas parasitológicas (xenodiagnóstico e/ou hemocultura), sendo todas positivas às provas sorológicas realizadas (Figuras 13, 14 e 15), dez em onze delas foram positivas à linfoproliferação, com as medianas indicadas na Figura 16. No grupo inconclusivo, uma amostra positiva ao exame parasitológico (1,54%), foi também positiva às provas TESA-blot e quimioluminescência (DO=0,201).

#### **4.11. Comparação entre positividade das provas sorológicas em pacientes do grupo crônico com parasitemia positiva e negativa**

A comparação entre os anticorpos detectados às provas: EAE, TESA e QUI (Figuras 13, 14 e 15) dos pacientes do grupo crônico com e sem parasitemia mostrou diferença estatisticamente significante para EAE ( $p < 0,0001$ ) e QUI ( $p = 0,0205$ ), respectivamente.

Na comparação entre a linfoproliferação observada nas amostras de pacientes do grupo crônico, negativos e positivos às provas parasitológicas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes tanto frente a 5 como a 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno. O mesmo foi observado quanto à frequência de positividade da prova TESA-blot, com 100% de positividade no grupo crônico com e sem parasitemia.

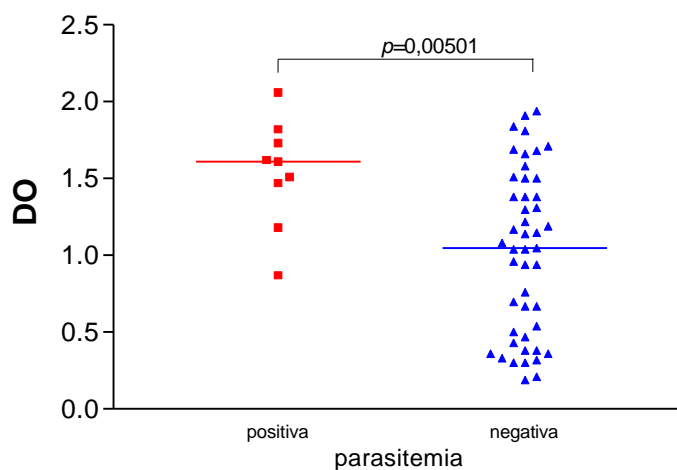


Figura 13. Distribuição dos resultados da prova EAE dos pacientes do grupo crônico ( $n=58$ ) segundo resultado às provas parasitológicas (xenodiagnóstico e/ou hemocultura). A linha representa a mediana dos valores. A análise entre os grupos revelou  $p=0,00501$  (Mann Whitney)



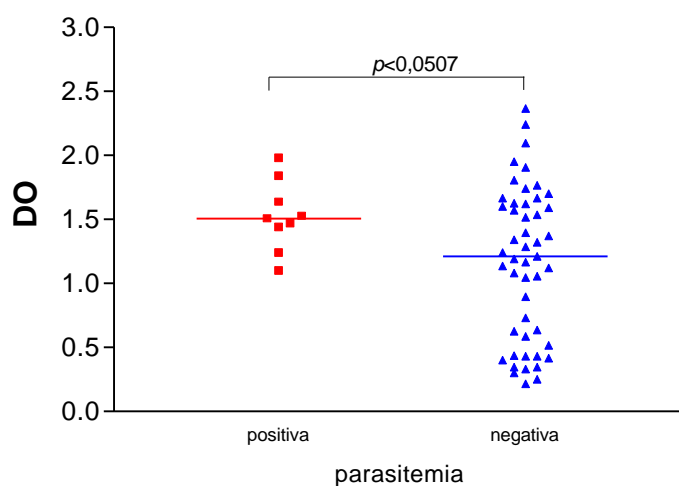


Figura 14. Distribuição dos resultados da prova TESA dos pacientes do grupo crônico ( $n=58$ ) segundo resultado às provas parasitológicas (xenodiagnóstico e/ou hemocultura). A linha representa a mediana dos valores. A análise entre os grupos revelou  $p=0,0507$  (Mann Whitney)

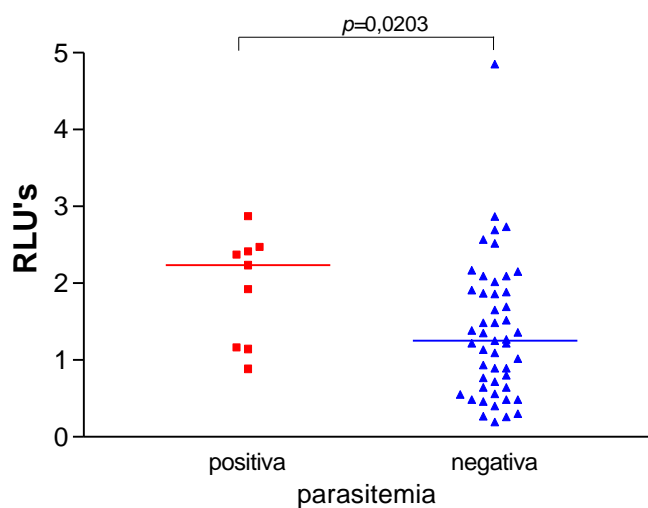


Figura 15. Distribuição dos resultados da prova de quimioluminescência do grupo crônico ( $n=58$ ) segundo os resultados das provas parasitológicas. A linha representa a mediana dos valores. A comparação entre as RLU's dos dois grupos revelou  $p=0,0203$  (Mann Whitney).  
RLU's = Unidades relativas de luminescência.

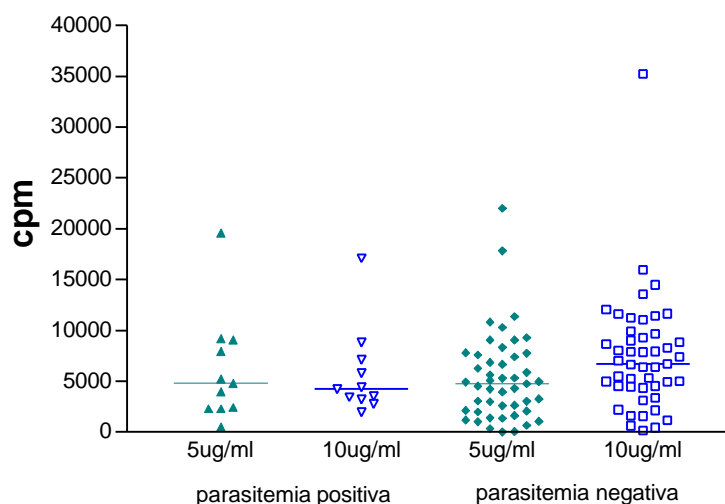


Figura 16. Distribuição dos resultados da prova de linfoproliferação (5 e/ou 10  $\mu\text{g/ml}$ ) do grupo crônico ( $n=58$ ) segundo os resultados das provas parasitológicas. A linha representa a mediana dos valores.

#### 4.12. Análise das amostras com duas ou mais provas sorológicas positivas e três ou mais parâmetros positivos no grupo inconclusivo

##### 4.12.1. Presença de duas ou mais provas sorológicas positivas

Observou-se que cerca de 21,9% indivíduos do grupo inconclusivo possuem duas ou mais provas sorológicas positivas.

Analisando-se a procedência (Nordeste, Sudeste, Interior de São Paulo e Grande São Paulo) dos pacientes do grupo inconclusivo, verifica-se que há diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos dos grupos crônico–inconclusivo e entre crônico–controle, quanto à presença de duas ou mais provas sorológicas positivas.

#### **4.12.2. Presença de um a sete parâmetros positivos às provas sorológicas, linfoproliferação, parasitemia e dados epidemiológicos.**

Ao se considerar a presença de sete parâmetros (Tabela 8) na análise de quatro provas sorológicas (EAE, TESA, quimioluminescência, TESA-blot), linfoproliferação frente a 5 e/ou 10 µg/ml de antígeno (um teste), bem como parasitemia pelos exames hemocultura e xenodiagnóstico (um teste) e antecedentes epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas (presença de triatomíneo na vizinhança ou familiares com a doença ou ter morado em casa de sapé, barro e madeira em região endêmica), observou-se que nos indivíduos com só um parâmetro ocorreram isoladamente um com linfoproliferação, positiva, dois com quimioluminescência positiva e um só com EAE positiva, todos sem dados epidemiológicos positivos para a doença.

Por outro lado, nos oito indivíduos que apresentaram apenas dois parâmetros positivos, quatro apresentaram só linfoproliferação positiva, sendo dois associados a parâmetros epidemiológicos sugestivos de doença (contato com barbeiro e familiar com doença), quatro moraram em zona endêmica e casa de barro e quatro apresentaram uma prova sorológica positiva (dois EAE, um QUI, um TESA) com antecedentes epidemiológicos positivos. A valorização dos dados epidemiológicos associada aos dados laboratoriais sugere um diagnóstico de suspeição nesses oito indivíduos, com necessidade de provas confirmatórias posteriormente.

A comparação das variáveis: frequência de duas ou mais provas sorológicas positivas, linfoproliferação positiva a 5 e/ou 10 µg/ml de antígeno, presença de dados epidemiológicos positivos (contato com triatomíneo ou familiar e/ou casa de barro sapé ou madeira) é significativamente diferente nos indivíduos com três ou mais parâmetros

positivos em relação àqueles com menos de três parâmetros positivos ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0267$ , respectivamente).

No grupo inconclusivo, quinze dos dezesseis pacientes com duas ou mais provas sorológicas positivas têm três ou mais parâmetros epidemiológicos positivos. Em contraste, cinco de 73 indivíduos deste grupo apresentaram 0-2 provas sorológicas positivas e menos de três parâmetros positivos. Paralelamente, todas as provas sorológicas (TESA-blot, EA, QUI e TESA) têm distribuição estatisticamente diferente pelo teste de Fisher entre indivíduos com  $< 3$  e  $\geq 3$  parâmetros positivos ( $p < 0,0001$  para TESA-blot e QUI,  $p < 0,002$  e para TESA e  $p = 0,00207$  para EAE) com destaque para a prova TESA-blot com 100% de resultados positivos nos últimos e 0% nos primeiros. Dessa forma, a última coluna da Tabela 8 assinala o diagnóstico de doença de Chagas provável no sub-grupo com três ou mais parâmetros positivos permitindo o diagnóstico da doença em 20,5% dos 73 indivíduos do grupo inconclusivo.

Em consonância com o índice  $\gamma$  encontrado entre TESA-blot e linfoproliferação (5 e/ou 10  $\mu\text{g/ml}$ ), a associação de ambas as provas eleva o número de resultados positivos de 15 para 20 em 73 indivíduos analisados, enfatizando-se quatro dos cinco pacientes com linfoproliferação positiva e TESA-blot negativa apresentam antecedentes epidemiológicos positivos para doença de Chagas.

Tabela 8. Distribuição dos dados epidemiológicos, provas sorológicas, parasitológicas e linfoproliferação no grupo inconclusivo segundo o número de parâmetros positivos. A área cinza representa os pacientes com diagnóstico sugestivo para doença de Chagas.

| n° de parâmetros positivos | n <sup>a</sup>  | %     | Presença de triatomíneo e/ou familiar <sup>b</sup> | Presença de triatomíneo, familiar e/ou casa <sup>b</sup> | n° de provas sorológicas + |    |    | TESA-blot | Linfoproliferação Positiva (5 e/ou 10 µg/ml) | Diagnóstico provável  |
|----------------------------|-----------------|-------|--|--|----------------------------|----|----|-----------|--|-----------------------|
|                            |                 |       |  |  | Total                      | 0  | 1  |           |  |                       |
| 0 <sup>c</sup>             | 02 <sup>c</sup> | 02,7  | IC   | IC   | 2                          | 0  | 0  | Negativo  | 0  | Não                   |
| 0                          | 17              | 23,3  | 0  | 0  | 17                         | 0  | 0  | Negativo  | 0  | Não                   |
| 1                          | 31              | 42,7  | 15   | 27   | 28                         | 03 | 0  | Negativo  | 1  | Não                   |
| 2                          | 08              | 10,9  | 04   | 07   | 4                          | 03 | 01 | Negativo  | 4  | Suspeito <sup>e</sup> |
| 3 <sup>d</sup>             | 02              | 02,7  | 01   | 01   | 0                          | 0  | 02 | Positivo  | 0  | Sim                   |
| 4                          | 08              | 10,9  | 06   | 08   | 0                          | 0  | 08 | Positivo  | 5  | Sim                   |
| 5                          | 02              | 02,7  | 0  | 02   | 0                          | 0  | 02 | Positivo  | 2  | Sim                   |
| 6                          | 03              | 04,1  | 02   | 03   | 0                          | 0  | 03 | Positivo  | 3  | Sim                   |
| Total                      | 73              | 100,0 | 28   | 48   | 51                         | 06 | 16 |           | 15   |                       |

a - n=73 (número de indivíduos analisados).

b - Número de pacientes com parâmetros epidemiológicos positivos sugestivos de doença de Chagas.

c - Dois indivíduos com informações incompletas (IC) sobre antecedentes epidemiológicos e com os 6 parâmetros restantes negativos.

d - Um paciente com parasitológico positivo, TESA-blot e quimioluminescência positivas.

e - Suspeito: Análise individual com base em dados epidemiológicos, sorológicos e de linfoproliferação.

## **Discussão**

## 5. Discussão

O estudo da linfoproliferação com finalidade diagnóstica com antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi* associadamente a provas sorológicas de elevada sensibilidade e especificidade foi realizado pela primeira vez, incluindo amostras de pacientes com provas sorológicas convencionais positivas e inconclusivas para a doença de Chagas, verificando-se ser um método capaz de discriminar pacientes chagásicos crônicos de indivíduos controle com sensibilidade de 83,3% e com especificidade de até 90,7%.

A linfoproliferação foi positiva em 20,5% dos indivíduos do grupo inconclusivo, mostrando concordância com mais de uma prova sorológica em 66,6% ( $n=40$ ) dos indivíduos com doença de Chagas crônica e em 11 (15,1%) de 73 amostras do grupo inconclusivo. Em cinco pacientes do grupo inconclusivo, apenas a linfoproliferação foi positiva, sendo que desses casos, quatro possuíam antecedentes epidemiológicos sugestivos de doença de Chagas.

Em nosso estudo, o estímulo com antígenos de formas epimastigotas mostrou ser eficiente no reconhecimento dos linfócitos de pacientes da forma crônica da doença de Chagas, assim como demonstrado por Bahia-Oliveira *et al.* 2000, que encontraram nível semelhante de linfoproliferação com antígenos de formas epimastigotas e tripomastigotas em pacientes com a doença. A diferença observada em nosso trabalho entre pacientes e controles nos ensaios de linfoproliferação com antígenos de formas epimastigotas foi também registrada por Barros-Mazon *et al.*, 2004 usando antígenos de formas tripomastigotas.

A especificidade da linfoproliferação também foi avaliada em pacientes com leishmaniose cutânea tratada, desafiados com antígeno de formas epimastigotas de *T.*

*cruzi*, mostrando resultados negativos. Além disso, todas as amostras positivas à linfoproliferação foram analisadas com antígeno recombinante rk-39, com resultados negativos.

Algumas amostras de indivíduos do grupo controle tiveram resposta linfoproliferativa positiva em nosso trabalho, embora significativamente menores que as encontradas nos grupos crônico e inconclusivo. Tal resposta linfoproliferativa positiva em indivíduos controle também foi encontrada por Piuvezam *et al.*, 1993, que estudaram o reconhecimento de antígenos do parasito por células T. A concentração de antígeno de 5 µg/ml revelou ter melhor desempenho quanto à especificidade em amostras de indivíduos controles, porém o emprego de 10 µg/ml permitiu revelar outras amostras de pacientes do grupo inconclusivo, além de apresentar melhores índices de correlação observados com outras provas sorológicas. Paralelamente, não se observou diferença significativa quando ambas as concentrações de antígeno foram comparadas. Dessa forma, optou-se por considerar as duas concentrações de antígenos para fins de análise.

Este bom desempenho da linfoproliferação acrescentando o reconhecimento de novos pacientes tem importância, porque segundo Brener *et al.*, 1997 e Dias *et al.*, 1989, cerca de 60-70% dos indivíduos crônicos evoluem sem sinais e sintomas, o que pode dificultar o processo de triagem em bancos de sangue. Reconheceu-se a importância a dados epidemiológicos relevantes por vezes ignorados tais como: presença de familiares com a doença de Chagas, tipo de casa onde morou, presença do “barbeiro” na casa e/ou vizinhança, considerados sugestivos de doença de Chagas em nosso trabalho com diferença bastante significativa entre os grupos crônico e inconclusivo, similarmente ao relatado por Salles *et al.* 1996, podendo, pois, ser úteis na triagem de doadores.



Por outro lado, resultados conflitantes entre provas sorológicas convencionais como hemaglutinação e imunofluorescência indiretas são freqüentes em bancos de sangue tendo-se observado baixo grau de concordância entre estas provas realizadas pré-inclusão no trabalho e as provas empregadas no presente trabalho com o TESA-blot, TESA, QUI e EAE.

A escolha das provas TESA-blot e da reação de quimioluminescência como referências adicionais foi feita pelo alto desempenho demonstrado em pacientes crônicos e controles, respectivamente, por Umezawa *et al.*, 1996, e Almeida *et al.*, 1997, que observaram níveis de 100% de sensibilidade e especificidade. Confirmou-se, em nosso trabalho, nesses mesmos grupos de pacientes crônicos e controles, o desempenho da prova TESA-blot, única com 100% de sensibilidade e especificidade e com maior concordância com as provas TESA, quimioluminescência e linfoproliferação. Os resultados observados com a prova de quimioluminescência em pacientes crônicos e controles mostraram também elevados índices de sensibilidade e especificidade, de 94,7% e 97,7%, respectivamente.

Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre os grupos crônico e controle, crônico e inconclusivo e inconclusivo e controle, quando analisados às provas sorológicas EAE, TESA, QUI. Diferenças significantes também foram mostradas à análise estatística quando comparados os grupos crônico-inconclusivo e crônico-controle para a linfoproliferação frente aos antígenos 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , sendo similar entre inconclusivo e controle. Tais dados sugerem fortemente que o grupo inconclusivo seja constituído por parte indivíduos com comportamento similar aos indivíduos controle e alguns similares aos pacientes chagásicos crônicos, conforme

observado às Figuras 3, 4, 6 e 7. Essa indicação foi confirmada pelo estudo da procedência dos últimos, que mostra diferença entre os grupos crônico e inconclusivo, havendo similaridade entre pacientes dos grupos inconclusivo e controle.

No grupo crônico, apenas de 19% foram positivos à prova parasitológica de hemocultura e/ou xenodiagnóstico. Embora representem a prova indubitável da infecção, a baixa sensibilidade encontrada aliada ao longo tempo para o resultado final dessas provas, as tornam de difícil aplicação à prática rotineira nos laboratórios de análise clínica.

No grupo inconclusivo, a parasitemia indireta foi comprovada em apenas um paciente (1,54%) associadamente às provas de TESA-blot positiva e quimioluminescência, com unidades relativas de luminescência limítrofe de 0,21.

A associação dos resultados de duas provas parasitológicas (hemocultura e xenodiagnóstico), no grupo crônico por nós estudados, revelou-se pouco sensível (18,9%) quando comparado aos dados de Luz *et al.*, 1994, que encontraram cerca de 94% à hemocultura e Brener *et al.*, 1965, que em associação aos dois testes, chegaram a 42,8% de positividade em pacientes chagásicos crônicos. Santos *et al.*, 1999, mostraram resultados similares aos encontrados em nosso estudo à hemocultura e ao xenodiagnóstico com cerca de 22,2% e 19,4%, respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas ao tempo de afastamento das zonas endêmicas ou a outras diferenças operacionais, tais como tempo de processamento do material e fatores interferentes na viabilidade dos triatomíneos.

Mesmo sendo laboriosos, demorados e de difícil aplicação à rotina, a hemocultura e o xenodiagnóstico têm importância por se constituírem em padrão-ouro no diagnóstico

da doença de Chagas e no controle pós-terapêutico, conforme descrito respectivamente por Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003 e Sartori *et al.*, 2002, sendo de valor principalmente quando as provas sorológicas resultarem inconclusivas.

Observou-se no conjunto de quatro provas sorológicas e ensaios de linfoproliferação, que TESA-blot se constituiu em melhor prova de referência, sendo positiva em soros de 15 de 73 (20,5%) indivíduos analisados. Tais dados são similares aos observados por Amato Neto *et al.*, 2005 por TESA-blot em amostras discordantes para as provas de hemaglutinação, imunofluorescência e ELISA e superiores aos referidos por Silveira-Lacerda *et al.*, 2004, com 2,87% de amostras positivas em soros com resultados inconclusivos por ELISA por reação de imunofluorescência. A diversidade entre tais resultados pode ser explicada pela diferente procedência dos doadores e pelas diferenças no processo de triagem, em vários laboratórios diferentes e usando reagentes nem sempre similares. Quanto aos resultados de quimioluminescência, 14 de 73 indivíduos do grupo inconclusivo foram positivos; em estudo com o mesmo antígeno, Almeida *et al.*, 1997 relataram a 12,2% de positividade em um painel de soros previamente triados por resultados duvidosos definidos segundo cada teste empregado, diferentemente do presente trabalho.

Adicionalmente verifica-se, pelo grau de concordância entre TESA-blot e linfoproliferação com 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , ( $\kappa = 0,613 - 0,667$ ), que epitopos distintos são reconhecidos por tais provas. Utilizada como referência a linfoproliferação (5 e/ou 10  $\mu\text{g/ml}$ ), 15 pacientes foram reconhecidos, cinco dos quais sem anticorpos, porém quatro destes com antecedentes epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas. Tal

associação de linfoproliferação positiva com antecedentes epidemiológicos sugestivos de doença de Chagas sugere, a nosso ver, a suspeita diagnóstica mesmo em indivíduos sem anticorpos detectáveis anti *T. cruzi*, reforçando a sua utilidade e a necessidade de outras provas confirmatórias de imunidade celular ou molecular.

Um aspecto relevante em nosso trabalho foi a indicação de que a combinação de quatro provas sorológicas, linfoproliferação e dados epidemiológicos sugestivos da doença de Chagas pode indicar um diagnóstico provável de doença de Chagas quando três ou mais parâmetros de sete utilizados forem positivos. Paralelamente, duas ou mais provas sorológicas positivas ocorreram em todos os indivíduos com três ou mais parâmetros positivos, sendo a prova TESA-blot positiva em 100%, quando ambas as condições estiveram presentes e ausente em 100% dos indivíduos com menos de três parâmetros positivos.

Um dos problemas no presente trabalho foi representado pelo grupo controle, cuja origem não foi o banco de sangue e cujas características pessoais (idade e sexo) e antecedentes epidemiológicos foram distintos dos grupos crônico e inconclusivo, esses mais comparáveis quanto às características pessoais e variáveis epidemiológicas, mostrando diferenças significativas com relação à presença de barbeiro na vizinhança presença de familiares com a doença e moradia (todos os tipos de casa). No grupo inconclusivo, a análise descritiva de dados epidemiológicos dentro de dois subgrupos de pacientes com  $>$  ou  $\leq$  de duas provas sorológicas positivas sugere que se tratam de grupos distintos: um mais próximo do grupo crônico e um mais próximo do grupo controle quanto à procedência (estado de nascimento), presença de barbeiro e tipo de moradia.

Uma evidente vantagem de um grupo controle não procedente de zona endêmica é a segurança quanto à de ausência de infecção tanto em estudos imunológicos como moleculares. Com efeito, não havendo padrão-ouro como referência, foi importante demonstrar que ter este grupo controle para as provas sorológicas não convencionais de elevada sensibilidade, nessa primeira abordagem, da linfoproliferação em conjunto às provas de quimioluminescência e TESA-blot. O desempenho dos dois métodos foi analisado no grupo inconclusivo, mostrando-se que o TESA-blot apresenta-se com maior eficiência sem, no entanto, atingir o maior número de amostras positivas. O total de 19 amostras positivas por TESA-blot e/ou linfoproliferação em 73 (26,02%) analisadas foi alcançado com o acréscimo de mais quatro indivíduos com provas de linfoproliferação positivas sem anticorpos porém com a presença de dados epidemiológicos sugestivos da parasitose (Tabela 8 e Anexo 1), devendo-se validar posteriormente o valor do reconhecimento de antígenos de epimastigotas de *T. cruzi* por células de pacientes com epidemiologia para doença de Chagas sem anticorpos séricos detectáveis por quaisquer das provas empregadas.

Finalmente, embora sendo pequeno o número de amostras discordantes entre os resultados das provas de alto desempenho no grupo inconclusivo, há necessidade de se investigar o valor de novos métodos associados, bem como o emprego de tais técnicas em campo não como triagem mas como provas confirmatórias. Com o advento da biologia molecular, com métodos quantitativos e em tempo real, é de grande interesse o aprimoramento do diagnóstico dessa doença, visando assim diminuir custos em bancos de sangue e proporcionar respostas ao doador quando seus exames resultarem inconclusivos às provas sorológicas convencionais.

**CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

- 1 Observou-se pela primeira vez a utilidade da linfoproliferação no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas inconclusivas com antecedentes epidemiológicos sugestivos de doença de Chagas.
- 2 A análise do reconhecimento de antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi* (5µg/ml e 10 µg/ml) por linfoproliferação mostrou que o grupo inconclusivo é diferente do grupo crônico e similar ao grupo controle.
- 3 O estudo do nível de anticorpos anti-EAE, anti-TESA (ELISA), anti-mucina (quimioluminescência) e a frequência de anticorpos anti-TESA-blot mostraram que o grupo inconclusivo é diferente dos outros grupos, bem como o controle é diferente do crônico quanto à distribuição dessas variáveis.
- 4 Características epidemiológicas tais como: presença de barbeiro nas redondezas e presença de familiares com a doença de Chagas e tipo de moradia foram consideradas sugestivas de doença de Chagas; com maior frequência no grupo crônico que no grupo inconclusivo, ressaltando a sua importância nos processos de triagem em bancos de sangue.
- 5 A prova TESA-blot mostrou o melhor desempenho no estudo de soros de pacientes com provas sorológicas positivas e grupo controle para doença de

Chagas com cerca de 100% de sensibilidade e especificidade, seguindo-se em ordem decrescente, EAE, quimioluminescência/TESA-ELISA e linfoproliferação.

- 6 A prova TESA-blot foi isoladamente a prova mais útil para diagnóstico da doença de Chagas em indivíduos do grupo inconclusivo com quinze amostras positivas em 73 (20,5%); em associação com a linfoproliferação de indivíduos com antecedentes epidemiológicos sugestivos da doença, houve acréscimo do número de amostras positivas para 19 (26,02%).
- 7 Provas parasitológicas indiretas foram positivas em um paciente do grupo inconclusivo e em 18,9% no grupo crônico, sendo os níveis de anticorpos detectados por EAE e quimioluminescência estatisticamente diferentes nos pacientes crônicos com e sem parasitemia.
- 8 A análise de sete parâmetros (4 provas sorológicas, uma prova parasitológica, uma prova de linfoproliferação: 5 e/ou 10  $\mu\text{g/ml}$  e um antecedente sugestivo da doença de Chagas) indicou ser provável o diagnóstico de doença de Chagas em 15 de 73 indivíduos (20,5%) do grupo inconclusivo; a presença de dois parâmetros positivos levantou a suspeita diagnóstica em sete indivíduos com epidemiologia sugestiva da doença, sugerindo-se que as últimas amostras sejam submetidas a testes confirmatórios.



- 9 As variáveis duas ou mais provas positivas, particularmente TESA-blot, linfoproliferação (5 e/ou 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e dados epidemiológicos positivos foram associados a três ou mais parâmetros positivos em sete analisados.

## **REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990; 85: 513-17.
- Almeida IC, Covas DT, Soussumi LMT, Travassos LR. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. 1997; 37: 850-7.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1994; 304:793-802.
- Amato-Neto V, De Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW. Observações sobre o TESA-blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38: 534-535.
- Andrews NW, Colli W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool*. 1982; 29: 264.
- ANVISA.[http://www.anvisa.gov.br/sangue/hemoterapia/relatorios\\_producao/resumo\\_SP.ppt](http://www.anvisa.gov.br/sangue/hemoterapia/relatorios_producao/resumo_SP.ppt) 2002
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrarri TC, Lemos EM, Luz ZMP, Moreira MC, Gazzinelli G, Correia-Oliveira R. Immunological and

- clinical evaluation in chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis.* 2000; 182: 634-8.
- Barros-Mazon S, Abrahamsohn IA. IL-12 enhances proliferation of peripheral blood mononuclear cells from Chagas' disease patients to *Trypanosoma cruzi* antigen. *Immunol. Lett.* 1997; 57: 39-45.
- Barros-Mazon S, Guariento ME, da Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol.* 2004; 111:137-45.
- Borges-Pereira J, Willcox HPF, Marcondes CB, Coura JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 39-44.
- Brener Z, Chiari E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J Parasitol.* 1965; 51:922-6.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997; 114:103-10.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Haslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Winker P. Polymerase chain reaction

- detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995; 110:241-7.
- Britto C, Cardoso MA, Winker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993; 88:1711-2.
- Burns JMJR, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-treated antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90,775-9.
- Camargo ME, Amato-Neto V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1974; 16: 200-2.
- Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Saez-Alquezar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*. 1993; 33: 830-4.
- Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 22: 19-23, 1989.

- Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG antibody reativity with *Trypanosoma cruzi* and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Med Hyg.* 1990; 43: 650-6.
- Corral RS, Altcheh J, Alexandre SR, Grinstein S, Freilij H, Katzin AM. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1957-62.
- Coura JR, Borges-Pereira J, Alves-Filho FI, de Castro JA, Cunha RV, Costa W, Junqueira AC. Morbidity of Chagas' disease in areas of Sertão da Paraíba and Caatinga do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 29: 197-205.
- Dawson B, Trapp RG. *Bioestatística Básica e Clínica.* 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda: 2003. p.102.
- de Souza SL, Camargo ME. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1966; 8: 255-8.
- Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. General situation and perspectives of Chagas' disease in Northeastern Region, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2000; 16: 13-34.
- Dias JCP. The indeterminate form from human Chagas' disease. A clinical epidemiological review. *Rev Soc Min Med Trop.* 1989; 22: 147-56.
- Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CLM, Chaudoir BM, Engman DM. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol.* 1995; 32:971-4.

- Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:205-10.
- Kirchhoff, VL. American trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the Unites States. *N Engl J Med.* 1993; 329: 639-44.
- Krautz GM, Galvão LM, Cançado JR. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1995. 33: 2086-90.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46: 427-34.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 15: 227(5259):680-5.
- Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hamagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 639-42.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.

- Luz LMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994; 27: 143-48.
- Marcon GEB, Andrade PD, Albuquerque DM, Wanderley JS, Almeida EA, Guariento ME, Costa SCB. Use for a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43:39-43.
- Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2003; 11:7-31.
- Ministério da Saúde – Coordenação de Sangue e Hemoderivados / SPS. Serviços produzidos 1998.
- Paranhos-Bacalla GS, Santos MR, Cotrim PC, Rassi A, Jolivet M, Camargo ME, Da Silveira JF. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol*. 1994; 16: 165-9.
- Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM, Jr. Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 971-4.



- Piuevezam MR, Russo DM, Burns JM, Skeiky AW, Grabstein KH, Reed SG. Characterization of responses of normal human T cells to *Trypanosoma cruzi* antigens. *J Immunology*. 1993; 150: 916-24.
- Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37: 107-15.
- Ribeiro dos Santos G, Nishiya AS, Sabino EC, Chamone DF, Sáez-Alquézar A. An improved, PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Ann. of Trop. Med. Parasitol*. 1999; 93: 689-94.
- Salles NA, Sabino EC, Barreto CC. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Rev Panam Salut Publica/Pan Am/ Public Health*. 2003; 13(2/3).
- Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonca MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Saez-Alquezar A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive *Brazilian blood donors*. *Transfusion*. 1996; 36: 969-73.
- Sartori AM, Neto JE, Nunes EV, Braz LM, Caiaffa-Filho HH, Oliveira Oda C Jr, Neto VA, Shikanai-Yasuda MA. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*. 2002; 186:872-5.

- Sartori, AM. Parasitemia por *Trypanosoma cruzi* em pacientes com doença de Chagas crônica co-infectados por vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.
- Silveira AC & Vinhaes M. Grupo de Trabalho em Doença de Chagas, FUNASA, Ministério da Saúde, 2000.
- Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang*. 2004; 87:204-7.
- Teixeira RL, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest*. 1978; 62: 1132-41.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76:4350-4.
- Tschudi EI, Anziano DF, Dalmasso AP. Lymphocyte transformation in Chagas *Disease Infect Immun*. 1972; 6: 906-8.
- Umezawa EF, Nascimento NS, Kesper NJR, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigen of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2143-7.

- Umezawa EF, Shikanai-Yasuda MA, Silveira JF, Cotrim PC, Paranhos G, Katzin AM. *Trypanosoma cruzi* detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetitive antigen. *Exp Parasitol.* 1993; 76: 352-7.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Parasitol.* 2001; 39: 169-76.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Gruber A, Pereira-Chiocolla VL, Zingales B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas' disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91: 87-93.
- Umezawa ES, Silveira JF. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 1:285-8.
- Vattuone NH, Szarfman A, Gonzalez Cappa SM. Antibody response and immunoglobulin levels in human with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). *J Trop Med Hyg.* 1973; 76: 45-7.
- Velasquez E, Reyes L, Thors C, Miettinen A, Chinchilla M, Linder E. Autoantibodies give false positive reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87: 35.

- Vergara U, Veloso C, Gonzalez A, Lorca M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 46: 39-43.
- Wendel Neto, S. Risco residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. Tese de Doutorado 2005.
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51: 771-7.
- World Health Organization (WHO) – Chagas disease – TDR strategic direction, February, 2002 – <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>.
- Zingales B, Golgher DB, Marmorato PG, Souto RP, Gruber A. Molecular approaches to diagnosis of Chagas' disease: use of defined antigens and target ribosomal RNA sequence. *Biol Res.* 1993; 26: 89-100.

**ANEXOS**

## Anexo A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO**

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ? F ?  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO.....Nº.....APTO: .....  
BAIRRO:..... CIDADE .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M ? F ?  
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....  
ENDEREÇO: .....Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO:.....CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

**II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Diagnóstico da doença de Chagas em bancos de sangue: linfoproliferação, detecção de anticorpos e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas.”

PESQUISADOR: Celia Regina Furucho

CARGO/FUNÇÃO: Técnico de laboratório

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas e parasitárias.

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

SEM RISCO ?                      RISCO MÍNIMO? X                      RISCO MÉDIO?  
RISCO BAIXO?                      RISCO MAIOR ?

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

**4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos**

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

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que tem como objetivo melhorar o diagnóstico da doença de Chagas. Caso concorde, será colhido sangue de veia periférica. Este procedimento não irá alterar seu diagnóstico nem a evolução da doença, mas poderá ser útil no diagnóstico de outras pessoas. Você poderá aceitar ou não, sem qualquer prejuízo para a assistência e orientação ao seu tratamento no Ambulatório ou Enfermaria da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP. Não haverá riscos adicionais, exceto o da coleta de sangue com possibilidade mínima de sangramento leve fora dos vasos sanguíneos.

**IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA consignando:**

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Célia Regina Furuchó – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 - térreo das 7h30min às 16h30min, Laboratório de Imunologia- LIM 48 sala 4. Fones- 30667047 e 30667048.  
Maria Aparecida Shikanai Yasuda- Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255- 4º andar. Fone- 30813451.

**VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:****VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

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

São Paulo, de de 200\_\_

\_\_\_\_\_  
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome legível)

Anexo1. Distribuição de dados epidemiológicos, resultados das provas de linfoproliferação frente à 5 e 10 µg/ml de antígeno, provas sorológicas (EAE, TESA, QUI e TESA-blot) e das provas parasitológicas das amostras dos pacientes do grupo inconclusivo (n=73).

| Identificação | Naturalidade                | Barbeiro - casa | Casa        | Picado | Mãe/doença | Familiar doença | Transfusão | Delta PHA | 5µg/ml | 10µg/ml | EAE   | TESA  | QUI   | TESA-blot | X e/ou H |
|---------------|-----------------------------|-----------------|-------------|--------|------------|-----------------|------------|-----------|--------|---------|-------|-------|-------|-----------|----------|
| 1             | Pavão - MG                  | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 18587     | 3623   | 4804    | 0,47  | 0,18  | 0,102 | p         | n        |
| 2             | Bezerros - PE               | sim             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 16161     | 198    | 145     | 0,19  | 0,04  | 0,09  | n         | n        |
| 3             | Guaimbé - SP                | sim             | pau a pique | não    | não        | não             | não        | 13355     | 202    | 1680    | 0,12  | 0,44  | 0,174 | n         | n        |
| 4             | São Paulo - SP              | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 5429      | 549    | 3374    | 0,09  | 0,06  | 0,023 | n         | NR       |
| 5             | São Paulo - SP              | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 13316     | 252    | 1409    | 0,18  | 0,18  | 0,201 | n         | n        |
| 6             | Oliveira dos Brejunhos - BA | não             | tijolo      | não    | não        | não             | não        | 5598      | 284    | 998     | 0,06  | 0,06  | 0,543 | n         | n        |
| 7             | Inhambupé - BA              | sim             | pau a pique | não    | não        | não             | não        | 20795     | 5225   | 3184    | 1,12  | 1,17  | 1,875 | p         | n        |
| 8             | Mombaça - CE                | não             | tijolo      | não    | não        | não             | não        | 16152     | 3      | 273     | 0,08  | 0,08  | 0,072 | n         | n        |
| 9             | Acopiara - CE               | sim             | tijolo      | não    | não        | não             | não        | 9600      | 228    | 660     | 0,27  | 0,23  | 0,316 | p         | n        |
| 10            | Rolândia - PR               | não             | madeira     | não    | não        | NT              | não        | 14902     | 2001   | 2438    | 0,35  | 0,31  | 0,125 | p         | n        |
| 11            | Jequeri MG                  | sim             | barro       | não    | não        | sim             | não        | 15554     | 497    | 1798    | 0,16  | 0,17  | 0,082 | n         | n        |
| 12            | Pindaí - BA                 | sim             | sapé        | sim    | não        | não             | não        | 10513     | 5147   | 5066    | 0,26  | 0,2   | 0,108 | p         | n        |
| 13            | BA                          | não             | NT          | não    | NT         | NT              | NT         | 18768     | 0      | 0       | 0,07  | 0,05  | 0,104 | n         | n        |
| 14            | Barbacena - MG              | não             | madeira     | não    | não        | não             | não        | 17027     | 0      | 0       | 0,076 | 0,077 | 0,064 | n         | n        |
| 15            | São Paulo - SP              | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 8953      | 0      | 0       | 0,054 | 0,086 | 0,132 | n         | n        |
| 16            | Ribeirão Vermelho-MG        | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 12280     | 13268  | 15310   | 0,17  | 0,11  | 0,018 | n         | n        |
| 17            | Itapeva - SP                | não             | madeira     | não    | não        | não             | sim        | 27822     | 295    | 157     | 0,066 | 0,172 | 0,054 | n         | NR       |
| 18            | São Paulo - SP              | não             | tijolo      | não    | não        | não             | não        | 8415      | 423    | 510     | 0,05  | 0,07  | 0,085 | n         | n        |
| 19            | Ibitira - BA                | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 21179     | 0      | 0       | 0,06  | 0,03  | 0,121 | n         | n        |
| 20            | São Paulo-SP                | não             | alvenaria   | não    | não        | sim             | não        | 11931     | 375    | 1662    | 0,09  | 0,07  | 0,062 | n         | n        |
| 21            | Mundo Novo - BA             | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 10952     | 1321   | 2456    | 0,1   | 0,04  | 0,042 | n         | n        |
| 22            | Itabirinha de Mantena - MG  | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 9789      | 4512   | 2579    | 0,05  | 0,1   | 0,078 | n         | n        |
| 23            | Olho d'água Grande - AL     | não             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 14667     | 400    | 717     | 0,04  | 0,11  | 0,039 | n         | n        |
| 24            | Tefé - AM                   | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 15890     | 3975   | 4526    | 0,18  | 0,14  | 0,245 | p         | n        |
| 25            | Paraú - RN                  | sim             | barro       | não    | não        | não             | não        | 8628      | 529    | 323     | 0,13  | 0,08  | 0,087 | n         | n        |
| 26            | Rio Gde do Norte - PR       | sim             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 23194     | 1654   | 1886    | 0,24  | 0,14  | 0,213 | p         | n        |
| 27            | Cunha - SP                  | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 14606     | 212    | 537     | 0,07  | 0,05  | 0,014 | n         | n        |
| 28            | Barbacena - MG              | não             | sapé        | não    | não        | não             | não        | 17706     | 66     | 204     | 0,114 | 0,141 | 0,085 | n         | NR       |
| 29            | São Francisco - MG          | sim             | barro       | sim    | não        | sim             | não        | 12392     | 0      | 574     | 0,19  | 0,13  | 0,102 | n         | n        |
| 30            | Batateira - PE              | não             | barro       | não    | não        | não             | não        | 25514     | 32     | 639     | 0,04  | 0,44  | 0,197 | n         | n        |
| 31            | Fanca - BA                  | sim             | alvenaria   | não    | não        | não             | não        | 28240     | 336    | 271     | 0,05  | 0,06  | 0,083 | n         | n        |
| 32            | Comecinho - MG              | sim             | barro       | não    | não        | não             | não        | 15155     | 142    | 403     | 0,1   | 0,1   | 0,084 | n         | n        |
| 33            | São Fco da Penha-RS         | não             | madeira     | não    | não        | não             | não        | 24400     | 780    | 903     | 0,11  | 0,07  | 0,091 | n         | n        |
| 34            | Várzea da Cruz - PB         | não             | madeira     | NT     | não        | não             | não        | 4708      | 561    | 267     | 0,12  | 0,04  | 0,108 | n         | n        |
| 35            | Eldorado Paulista - SP      | não             | pau a pique | não    | não        | não             | não        | 11698     | 41     | 74      | 0,12  | 0,13  | 0,114 | n         | n        |
| 36            | Amargoza - BA               | não             | barro       | não    | não        | sim             | não        | 5073      | 1479   | 1904    | 0,07  | 0,11  | 0,333 | p         | NR       |
| 37            | Riversul - SP               | sim             | madeira     | não    | não        | não             | não        | 6996      | 14     | 14      | 0,052 | 0,102 | 0,063 | n         | NR       |
| 38            | Itambaracá - PR             | sim             | sapé        | não    | não        | sim             | não        | 10081     | 605    | 2516    | 0,18  | 0,37  | 0,215 | p         | n        |



|    |                            |     |             |     |     |     |     |       |       |       |       |       |       |   |    |
|----|----------------------------|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|----|
| 39 | Pindaí - BA                | sim | barro       | não | não | sim | não | 12266 | 3770  | 4883  | 0,26  | 0,45  | 0,314 | p | n  |
| 40 | Suzano - SP                | não | tijolo      | não | não | não | não | 8277  | 444   | 1050  | 0,04  | 0,04  | 0,065 | n | n  |
| 41 | Itabaiana - PB             | não | barro       | não | não | não | não | 13586 | 4758  | 4961  | 0,14  | 0,45  | 0,419 | p | n  |
| 42 | Assis - SP                 | sim | alvenaria   | não | sim | sim | não | 9504  | 18    | 695   | 0,11  | 0,14  | 0,032 | n | n  |
| 43 | Arapiraca - AL             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 14089 | 151   | 341   | 0,02  | 0,06  | 0,077 | n | n  |
| 44 | Jupi - PE                  | não | alvenaria   | não | não | não | não | 9590  | 189   | 1032  | 0,113 | 0,056 | 0,03  | n | NR |
| 45 | São Paulo - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 30926 | 1373  | 1384  | 0,06  | 0,04  | 0,082 | n | n  |
| 46 | Teixeiras - MG             | não | pau a pique | não | não | não | não | 16983 | 8     | 143   | 0,1   | 0,01  | 0,034 | n | n  |
| 47 | Paratinga - BA             | sim | barro       | não | não | não | não | 20750 | 1583  | 4042  | 0,22  | 0,1   | 0,192 | p | n  |
| 48 | Botucatu - SP              | não | alvenaria   | não | não | não | não | 12553 | 655   | 111   | 0,36  | 0,14  | 0,118 | n | n  |
| 49 | São Paulo - SP             | não | barro       | não | não | sim | não | 16204 | 427   | 1865  | 0,3   | 0,11  | 0,089 | n | NR |
| 50 | Guaraci-PR                 | não | barro       | não | não | não | não | 21283 | 16533 | 22714 | 0,25  | 0,78  | 0,277 | p | n  |
| 51 | Peres - SP                 | não | NT          | não | não | não | não | 11827 | 0     | 0     | 0,07  | 0,04  | 0,012 | n | n  |
| 52 | Tauá - CE                  | não | alvenaria   | não | não | não | não | 26053 | 26    | 16    | 0,06  | 0,05  | 0,054 | n | n  |
| 53 | Garanhuns - PE             | não | barro       | não | não | não | não | 11943 | 0     | 61    | 0,13  | 0,15  | 0,089 | n | n  |
| 54 | Caculé - BA                | sim | taipa       | não | não | sim | não | 5407  | 247   | 558   | 0,1   | 0,01  | 0,061 | n | n  |
| 55 | Cauçu - SP                 | sim | sapé        | não | não | sim | não | 18923 | 138   | 355   | 0,09  | 0,04  | 0,023 | n | n  |
| 56 | Sales - SP                 | sim | barro       | não | não | sim | não | 20491 | 193   | 390   | 0,13  | 0,06  | 0,095 | n | n  |
| 57 | São Paulo - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 6375  | 117   | 539   | 0,034 | 0,033 | 0,067 | n | n  |
| 58 | Jacaraci - BA              | sim | barro       | não | não | sim | não | 6975  | 6042  | 3735  | 0,179 | 0,023 | 0,077 | n | n  |
| 59 | São João da Ponte - MG     | sim | alvenaria   | não | não | não | não | 10840 | 52    | 220   | 0,14  | 0,11  | 0,059 | n | n  |
| 60 | Francisco Badaró - MG      | sim | barro       | não | não | não | não | 26460 | 7108  | 8779  | 0,05  | 0,08  | 0,331 | p | n  |
| 61 | Taquaritinga do Norte - PE | não | alvenaria   | não | não | não | não | 8007  | 207   | 816   | 0,023 | 0,025 | 0,051 | n | n  |
| 62 | São Paulo - SP             | sim | alvenaria   | não | não | não | não | 9540  | 0     | 0     | 0,15  | 0,04  | 0,122 | n | n  |
| 63 | Quebrangulo - AL           | não | taipa       | não | não | não | não | 16014 | 95    | 6     | 0,05  | 0,02  | 0,129 | n | n  |
| 64 | Cidade do Cabo - PE        | sim | barro       | não | não | não | não | 6206  | 361   | 808   | 0,06  | 0,01  | 0,047 | n | NR |
| 65 | Guaraci - SP               | sim | barro       | sim | não | não | não | 12459 | 4677  | 605   | 0,17  | 0,09  | 0,101 | n | n  |
| 66 | Itiruçú - BA               | não | barro       | não | não | não | não | 18286 | 401   | 801   | 0,16  | 0,02  | 0,035 | n | n  |
| 67 | Guarulhos - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 12643 | 944   | 978   | 0,15  | 0,1   | 0,201 | p | p  |
| 68 | Tapejara - PR              | não | alvenaria   | não | não | não | não | 9476  | 164   | 216   | 0,119 | 0,335 | 0,351 | n | n  |
| 69 | NT                         | não | alvenaria   | não | não | não | não | 3789  | 1702  | 2056  | 0,02  | 0,09  | 0,1   | n | n  |
| 70 | São Paulo - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 20434 | 70    | 110   | 0,03  | 0,08  | 0,097 | n | n  |
| 71 | São Paulo - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 18215 | 0     | 0     | 0,12  | 0,2   | 0,044 | n | n  |
| 72 | São Paulo - SP             | não | alvenaria   | não | não | não | não | 5099  | 249   | 152   | 0,12  | 0,2   | 0,097 | n | n  |
| 73 | Teófilo Teotônio - MG      | não | barro       | não | não | não | não | 12643 | 0     | 218   | 0,14  | 0,11  | 0,011 | n | n  |

\* NT = não tem

\*\*NR = não realizado

Anexo 2. Distribuição de dados epidemiológicos, resultados das provas de linfoproliferação frente à 5 e 10 µg/ml de antígeno, provas sorológicas (EAE, TESA, QUI e TESA-blot) e das provas parasitológicas das amostras dos pacientes do grupo crônico (n=60).

| Identificação | Naturalidade               | barbeiro/casa | casa         | Picado?  | Mãe/doença? | família? | Transfusão? | d PHA | 5µg/ml | 10µg/ml | EAE  | TESA | QUI  | WB | XENO/HEMO |
|---------------|----------------------------|---------------|--------------|----------|-------------|----------|-------------|-------|--------|---------|------|------|------|----|-----------|
| 1             | Pernambuco - PE            | NT            | barro        | NT       | não         | não      | NT          | 40118 | 21996  | 35197   | 0,47 | 0,64 | 0,72 | p  | n         |
| 2             | São José Rio Preto - SP    | não           | pau-a-pique  | NT       | não         | não      | não         | 9681  | 2295   | 2736    | 1,18 | 1,10 | 1,92 | p  | p         |
| 3             | Francisco Badaró - MG      | sim           | barro        | não      | não         | sim      | não         | 15302 | 5332   | 4530    | 1,71 | 1,60 | 1,65 | p  | n         |
| 4             | Cochavanba - Bolívia       | sim           | alvenaria    | não      | não         | não      | não         | 15672 | 7780   | 8258    | 0,94 | 1,37 | 0,89 | p  | n         |
| 5             | Castro Alves - BA          | sim           | barro        | não      | não         | sim      | não         | 15977 | 2406   | 4402    | 1,87 | 2,10 | 2,57 | p  | p         |
| 6             | Inhambupé BA               | sim           | pau-a-pique  | não      | não         | não      | não         | 37281 | 5225   | 3184    | 1,12 | 1,17 | 1,22 | p  | p         |
| 7             | Itai - SP                  | NT            | NT           | NT       | NT          | sim      | não         | 10434 | 1032   | 2122    | 0,33 | 0,33 | 0,26 | p  | n         |
| 8             | Teixeira - PB              | sim           | barro        | sim      | não         | não      | não         | 21748 | 6253   | 12028   | 1,14 | 1,52 | 1,88 | p  | n         |
| 9             | Taquari - RS               | sim           | pau-a-pique  | NT       | NT          | NT       | NT          | 8567  | 486    | 1947    | 1,62 | 1,44 | 0,88 | p  | p         |
| 10            | Fco Badaró - MG            | NT            | NT           | não      | não         | não      | não         | 15900 | 9037   | 8777    | 1,82 | 1,84 | 1,14 | p  | p         |
| 11            | Piratininga - SP           | não           | NT           | não      | não         | não      | não         | 9599  | 4520   | 5324    | 1,69 | 1,63 | 1,38 | p  | n         |
| 12            | Sto. Estevão - BA          | não           | NT           | NT       | não         | não      | não         | 10550 | 10282  | 11033   | 1,38 | 1,95 | 2,73 | p  | n         |
| 13            | Flores - PE                | não           | tijolo       | não sabe | não         | sim      | não         | 7476  | 4213   | 4918    | 1,19 | 1,14 | 0,64 | p  | n         |
| 14            | Sto. Antonio de Jesus - BA | não           | rebocada     | não      | não         | não      | não         | 16204 | 7761   | 9238    | 0,96 | 1,34 | 1,48 | p  | n         |
| 15            | Mulungu do Morro - BA      | sim           | barro/taipa  | sim      | não         | sim      | não         | 22199 | 6634   | 11620   | 1,58 | 1,59 | 2,09 | p  | n         |
| 16            | Salvador - BA              | não           | barro        | não      | não         | não      | não         | 5327  | 2269   | 3532    | 1,47 | 1,24 | 2,23 | p  | p         |
| 17            | Macajuba - BA              | sim           | barro/taipa  | não      | não         | não      | não         | 14224 | 9295   | 9875    | 1,15 | 1,21 | 0,93 | p  | n         |
| 18            | Varzelândia - MG           | sim           | não rebocada | NT       | não         | sim      | não         | 12189 | 3040   | 8020    | 0,30 | 0,40 | 0,30 | p  | n         |
| 19            | Janaúba - MG               | sim           | barro        | não      | não         | não      | não         | 18211 | 7590   | 7368    | 1,04 | 1,06 | 1,87 | p  | n         |
| 20            | Ponte Nova - MG            | sim           | barro        | NT       | não         | não      | NT          | 11388 | 9065   | 8804    | 1,38 | 2,37 | 1,13 | p  | n         |
| 21            | Tamborim - CE              | sim           | sapé         | sim      | não         | não      | não         | 4551  | 1035   | 3094    | 0,50 | 0,30 | 0,48 | p  | n         |
| 22            | Simplício Mendes - PI      | sim           | barro        | sim      | não         | sim      | não         | 26172 | 0      | 102     | 0,76 | 0,44 | 0,64 | p  | n         |
| 23            | Mata de São João - BA      | sim           | barro        | não      | não         | não      | não         | 8809  | 7377   | 6371    | 1,05 | 1,05 | 2,69 | p  | n         |
| 24            | Itaporanga - SP            | sim           | barro/sapé   | não      | não         | não      | não         | 13484 | 3952   | 4973    | 0,21 | 0,22 | 0,19 | p  | n         |
| 25            | Castro Alves - BA          | sim           | barro        | não      | não         | sim      | não         | 17201 | 10820  | 11216   | 0,70 | 0,90 | 1,35 | p  | n         |
| 26            | Autim - PE                 | sim           | tijolo       | sim      | não         | não      | NT          | 4659  | 8316   | 11428   | 1,50 | 1,32 | 1,36 | p  | n         |
| 27            | Campinas - SP              | sim           | barro        | não      | não         | não      | não         | 20554 | 2037   | 4529    | 1,50 | 1,74 | 1,91 | p  | n         |
| 28            | Icó - CE                   | não           | alvenaria    | não      | NT          | sim      | não         | 22136 | 2603   | 7924    | 1,08 | 1,24 | 4,85 | p  | n         |
| 29            | Carpina - PE               | não           | tijolo       | não      | não         | sim      | não         | 14803 | 364    | 603     | 1,31 | 1,57 | 1,86 | p  | n         |
| 30            | Caculé - BA                | não           | fazenda      | não      | não         | não      | não         | 8925  | 1168   | 1544    | 1,22 | 1,12 | 1,27 | p  | n         |
| 31            | Tanque Daria - AL          | não           | adobe        | não      | não         | não      | não         | 13461 | 5835   | 7839    | 0,38 | 0,42 | 0,55 | p  | n         |
| 32            | São Francisco - MG         | sim           | pau-a-pique  | sim      | sim         | sim      | não         | 20879 | 13990  | 18897   | 1,52 | 1,77 | 1,88 | p  | NT        |
| 33            | São Francisco - MG         | sim           | barro        | não      | não         | não      | não         | 17948 | 5626   | 6611    | 0,36 | 0,63 | 1,09 | p  | n         |
| 34            | 1o. de Maio - PR           | sim           | madeira      | não      | não         | não      | não         | 11344 | 1368   | 2187    | 0,67 | 0,73 | 0,77 | p  | n         |
| 35            | Seabra - BA                | não           | barro        | não      | não         | não      | não         | 11008 | 4768   | 3415    | 1,51 | 1,51 | 1,16 | p  | p         |
| 36            | norte de Minas-MG          | sim           | tijolo       | não      | não         | sim      | sim         | 20105 | 9192   | 7131    | 0,87 | 1,53 | 2,41 | p  | p         |
| 37            | Francisco Sá - MG          | não           | madeira      | não      | não         | sim      | não         | 12834 | 58     | 421     | 0,32 | 0,59 | 0,48 | p  | n         |
| 38            | Pombal - PB                | sim           | tijolo       | não      | não         | sim      | não         | 10550 | 3014   | 5436    | 0,30 | 0,25 | 0,27 | p  | n         |

|    |                    |     |               |     |     |     |     |       |       |       |      |      |      |   |   |
|----|--------------------|-----|---------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|------|------|------|---|---|
| 39 | Irecê - BA         | não | tijolo        | não | não | sim | não | 6265  | 3947  | 5781  | 2,06 | 1,47 | 2,87 | p | p |
| 40 | Montes Claros - MG | não | barro         | não | não | não | não | 13899 | 4912  | 6388  | 0,36 | 0,35 | 0,56 | p | n |
| 41 | Itamira - BA       | sim | pau-a-pique   | não | não | sim | não | 24916 | 4966  | 9605  | 1,94 | 1,91 | 2,15 | p | n |
| 42 | Irecê - BA         | não | barro         | não | sim | sim | não | 13000 | 7922  | 4213  | 1,73 | 1,98 | 2,37 | p | p |
| 43 | Fco. Sá - MG       | sim | NT            | NT  | sim | sim | não | 18153 | 1337  | 1589  | 1,38 | 1,77 | 2,87 | p | n |
| 44 | São Francisco - MG | sim | barro         | NT  | NT  | NT  | não | 11115 | 2999  | 4457  | 1,91 | 1,67 | 1,22 | p | n |
| 45 | NT                 | NT  | NT            | NT  | NT  | NT  | NT  | 14218 | 17822 | 15917 | 1,30 | 1,29 | 0,46 | p | n |
| 46 | Jacobina - BA      | sim | barro         | não | não | não | não | 26332 | 19555 | 17080 | 1,61 | 1,64 | 2,47 | p | p |
| 47 | Piauí              | não | madeira       | não | não | sim | não | 5754  | 644   | 1148  | 1,68 | 1,70 | 2,52 | p | n |
| 48 | Montes Claros - MG | sim | alvenaria     | sim | não | não | não | 6165  | 5269  | 8984  | 1,81 | 1,81 | 1,52 | p | n |
| 49 | Igaporã - BA       | não | madeira       | não | não | não | não | 19132 | 3980  | 6677  | 1,00 | 0,76 | 1,12 | p | n |
| 50 | Guará - SP         | sim | barro         | sim | não | sim | não | 12765 | 11365 | 11579 | 0,54 | 0,52 | 1,02 | p | n |
| 51 | Pindobaçu - BA     | sim | barro/madeira | sim | não | sim | não | 15396 | 2109  | 7010  | 1,66 | 1,67 | 1,25 | p | n |
| 52 | Santos - SP        | não | alvenaria     | não | não | sim | não | 14030 | 6836  | 8652  | 1,84 | 2,24 | 2,02 | p | n |
| 53 | Maracá - SP        | sim | madeira       | não | não | não | não | 23357 | 5096  | 7869  | 0,94 | 1,08 | 1,48 | p | n |
| 54 | Palmital - SP      | não | tijolo        | não | sim | não | não | 5136  | 3251  | 4953  | 1,17 | 1,40 | 1,69 | p | n |
| 55 | Açaí - PR          | não | madeira       | não | não | não | não | 21722 | 1992  | 13549 | 0,38 | 0,43 | 0,48 | p | n |
| 56 | Souto Soares - BA  | não | barro         | não | não | sim | não | 9364  | 2577  | 3349  | 0,19 | 0,35 | 0,89 | p | n |
| 57 | Tuparetana - PE    | não | alvenaria     | não | não | sim | não | 17289 | 9036  | 14441 | 1,51 | 1,54 | 2,09 | p | n |
| 58 | Mirassol - SP      | não | madeira       | não | não | sim | não | 8176  | 4760  | 5252  | 0,67 | 1,19 | 0,80 | p | n |
| 59 | Turmalina - MG     | sim | barro         | não | não | não | não | 2585  | 1601  | 4316  | 1,04 | 1,62 | 2,17 | p | n |
| 60 | Mato Verde - MG    | não | alvenaria     | não | não | não | não | 16789 | 4281  | 6692  | 0,43 | 0,43 | 0,40 | p | n |

\* NT = não tem

\*\*NR = não realizado

Anexo 3. Distribuição de dados epidemiológicos, resultados das provas de linfoproliferação frente à 5 e 10 µg/ml de antígeno, provas sorológicas (EAE, TESA, QUI e TESA-blot) e das provas parasitológicas das amostras dos pacientes do grupo controle (n=43).

| Identificação | Naturalidade           | Barbeiro - casa | Casa      | Picado | Mãe/doença | Familiar doença | Transfusão | PHA   | 5µg/ml | 10µg/ml | EAE  | TESA | QUI  | TESA-blot |
|---------------|------------------------|-----------------|-----------|--------|------------|-----------------|------------|-------|--------|---------|------|------|------|-----------|
| 1             | Venezuela              | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 2834  | -125   | -157    | 0,09 | 0,25 | 0,12 | n         |
| 2             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 11654 | 2566   | 2723    | 0,09 | 0,04 | 0,06 | n         |
| 3             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 21448 | 877    | 481     | 0,05 | 0,02 | 0,07 | n         |
| 4             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 3427  | 485    | 1553    | 0,06 | 0,08 | 0,06 | n         |
| 5             | Cruz das almas - BA    | não             | madeira   | não    | não        | não             | não        | 14351 | 1412   | 1626    | 0,12 | 0,10 | 0,11 | n         |
| 6             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 26615 | 1      | -33     | 0,01 | 0,04 | 0,06 | n         |
| 7             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 19149 | -11    | 266     | 0,06 | 0,10 | 0,02 | n         |
| 8             | São Caetano do Sul-SP  | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 22855 | 44     | 456     | 0,06 | 0,07 | 0,09 | n         |
| 9             | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 18874 | 1289   | 2295    | 0,09 | 0,03 | 0,03 | n         |
| 10            | Marau-RS               | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 25151 | 380    | 983     | 0,10 | 0,06 | 0,05 | n         |
| 11            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 37422 | 604    | 800     | 0,09 | 0,12 | 0,06 | n         |
| 12            | Tupã-SP                | não             | alvenaria | não    | não        | sim             | não        | 19573 | 232    | 670     | 0,06 | 0,07 | 0,05 | n         |
| 13            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 13185 | 130    | 280     | 0,08 | 0,03 | 0,04 | n         |
| 14            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 11778 | 5876   | 3648    | 0,06 | 0,09 | 0,03 | n         |
| 15            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 4339  | -7     | 7       | 0,06 | 0,03 | 0,05 | n         |
| 16            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 20795 | 1148   | 3902    | 0,12 | 0,10 | 0,04 | n         |
| 17            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 23371 | 687    | 1768    | 0,11 | 0,07 | 0,09 | n         |
| 18            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 38319 | 244    | 482     | 0,02 | 0,04 | 0,01 | n         |
| 19            | Juazeiro do Norte - CE | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 12534 | 850    | 2965    | 0,12 | 0,16 | 0,09 | n         |
| 20            | RJ                     | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 9496  | -221   | -314    | 0,07 | 0,06 | 0,02 | n         |
| 21            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 9635  | 390    | 1483    | 0,11 | 0,20 | 0,06 | n         |
| 22            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 9277  | 715    | 3767    | 0,03 | 0,04 | 0,03 | n         |
| 23            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 7839  | 1946   | 4492    | 0,08 | 0,10 | 0,09 | n         |
| 24            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 13605 | 1967   | 0       | 0,02 | 0,05 | 0,04 | n         |
| 25            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 14233 | 166    | 530     | 0,06 | 0,07 | 0,07 | n         |
| 26            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 9081  | -466   | -391    | 0,06 | 0,05 | 0,09 | n         |
| 27            | RS                     | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 15825 | 287    | 537     | 0,06 | 0,03 | 0,03 | n         |
| 28            | Canadá                 | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 13130 | -114   | 448     | 0,05 | 0,06 | 0,09 | n         |
| 29            | Rio de Janeiro - RJ    | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 7221  | 384    | 2660    | 0,12 | 0,07 | 0,06 | n         |
| 30            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 6298  | 1491   | 3       | 0,06 | 0,08 | 0,03 | n         |
| 31            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 8207  | 489    | 172     | 0,06 | 0,08 | 0,07 | n         |
| 32            | Portugal               | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 24141 | 257    | 3971    | 0,15 | 0,04 | 0,06 | n         |
| 33            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 21376 | 257    | 509     | 0,04 | 0,10 | 0,07 | n         |
| 34            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 47928 | 614    | 998     | 0,09 | 0,05 | 0,09 | n         |
| 35            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 18544 | 593    | 1470    | 0,03 | 0,08 | 0,05 | n         |
| 36            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 12447 | -14    | 430     | 0,04 | 0,09 | 0,03 | n         |
| 37            | São Paulo-SP           | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 17552 | 213    | 585     | 0,03 | 0,04 | 0,07 | n         |
| 38            | Mirandópolis - SP      | não             | alvenaria | não    | não        | não             | não        | 11031 | 2011   | 107     | 0,05 | 0,10 | 0,05 | n         |

|    |              |     |           |     |     |     |     |       |      |      |      |      |      |   |
|----|--------------|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-------|------|------|------|------|------|---|
| 39 | São Paulo-SP | não | alvenaria | não | não | não | não | 15419 | 43   | 747  | 0,01 | 0,05 | 0,06 | n |
| 40 | Osasco - SP  | não | alvenaria | não | não | não | não | 26843 | -2   | -57  | 0,05 | 0,09 | 0,01 | n |
| 41 | São Paulo-SP | não | alvenaria | não | não | sim | não | 27686 | 5583 | 7961 | 0,14 | 0,16 | 0,09 | n |
| 2  | Itararé - SP | não | madeira   | não | não | não | não | 44207 | 1050 | 303  | 0,04 | 0,04 | 0,06 | n |
| 43 | Manaus-AM    | não | alvenaria | não | não | não | não | 8303  | 838  | 102  | 0,05 | 0,07 | 0,04 | n |

NT = não tem

\*\*NR = não realizado