

DISSERTAÇÃO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análise Clínicas

AMASTIGOTA DO TRYPANOSOMA CRUZI

UTILIZAÇÃO NAS TÉCNICAS DE DOT-ELISA E IMUNOFLORESCÊNCIA PARA A
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM E IgA NA DOENÇA DE CHAGAS.

TOKIKO KYOMEN MATSUMOTO

Dissertação para obtenção
do grau de Mestre

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo

1990

12559

Trabalho realizado nas Seções de
Imunologia e de Sorologia do Instituto
Adolfo Lutz com a colaboração do Instituto
de Medicina Tropical de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas e
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Deposited on 10/05/01

Ao Nelson e
à Juliana

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra EUFROSINA SETSU UMEZAWA

pela orientação, incentivo e confiança, em especial pela amizade dispensada durante todo o trabalho.

À Prof^a Dra. SUMIE HOSHINO SHIMIZU da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

pelo incentivo inicial, valiosas sugestões e revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ALEJANDRO KATZIN do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

pelas sugestões objetivas e pelo interesse na revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela acolhida, ensinamentos e sugestões na avaliação estatística, indispensáveis à realização deste trabalho;

Ao Paulo M. Nakamura, Pesquisador Científico da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz pela colaboração neste trabalho;

Ao Dr. Hélio Iwao Nakamura, médico chefe de Laboratórios da Sub-divisão de Epidemiologia do SESI pelo fornecimento das amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos e indivíduos normais;

À Prof^a Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP pelo fornecimento de soros de pacientes chagásicos agudos;

À Prof^a Dra. Júlia Manso Alves, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP pelo fornecimento de alguns lotes do antígeno de formas amastigotas do Trypanosoma cruzi;

À Raquel dos Anjos Fazioli, Pesquisadora Científica da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio, amizade e auxílio prestado na utilização do microcomputador;

Ao Almir Robson Ferreira do Setor de Desenho e Fotografia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela ilustração gráfica;

Ao Akira Wada da Vitec Produções Fotográficas Ltda pela documentação fotográfica;

Aos amigos e funcionários da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial aos Pesquisadores Henry I.Z. Requejo, Lourdes Redher de Andrade Vaz e Lima, Raquel Bellinati Pires e Elizabeth Natal De Gaspari pelo apoio, companheirismo e amizade;

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em particular à Maria da Glória Ribeiro Souza Coracini, Marilda Savóia Nascimento, Isabel Cristina Alves e Roseli dos Santos Malafrente pela participação, amizade e convivência.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

ABREVIATURAS

A	Forma amastigota do <u>Trypanosoma cruzi</u>
As	Antígeno solúvel da forma amastigota
At	Antígeno total da forma amastigota
Dot-ELISA	Dot enzyme-linked immunosorbent assay
DOT-As	Dot-ELISA com antígeno As
DOT-At	Dot-ELISA com antígeno At
DOT-Es	Dot-ELISA com antígeno Es
E	Forma epimastigota do <u>Trypanosoma cruzi</u>
Es	Antígeno solúvel da forma epimastigota
gl _e	grau de liberdade entre os grupos
gl _d	grau de liberdade dentro dos grupos
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFI-A	Imunofluorescência Indireta com antígeno A
IFI-E	Imunofluorescência Indireta com antígeno E
LR	Limiar de Reatividade
MGT	Média Geométrica dos Títulos
PM	Peso Molecular
p/v	Peso/Volume
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SI
TRIS	Tris(hidroxi-metil)aminometano
v/v	Volume/Volume

Soluções

PBS Tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2, NaCl 0,15M
Tris-NaCl Tampão Tris 0,02 M, NaCl 0,5 M pH 7,5

S U M Á R I O

	PÁG.
ABREVIATURAS	
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. Cultivo e obtenção das diferentes formas evolutivas do <u>Trypanosoma cruzi</u> , cepa Y.....	25
1.1. Epimastigota (E).....	25
1.2. Amastigota (A).....	26
2. Amostras de soros.....	27
2.1. Soros padrões.....	27
2.2. Soros de pacientes chagásicos.....	28
2.3. Soros de indivíduos normais.....	30
2.4. Soros de pacientes com outras etiologias.....	31
3. Testes sorológicos.....	33
3.1. Reação de Imunofluorescência indireta (IFI).....	33
3.1.1. Reagentes e soluções.....	33
3.1.2. Preparo dos antígenos.....	33
3.1.3. Diluições dos soros e conjugados fluorescentes	34
3.1.4. Desenvolvimento do teste.....	35
3.2. "Dot-enzyme linked immunosorbent assay" (Dot-ELISA).....	36
3.2.1. Reagentes e soluções.....	36
3.2.2. Preparo dos antígenos.....	36
3.2.3. Conjugados enzimáticos.....	39

BIBLIOTECA
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

3.2.4. Sensibilização da membrana de nitrocelulose..	40
3.2.5. Diluições dos soros e conjugados enzimáticos.	41
3.2.6. Desenvolvimento do teste.....	42
3.2.7. Avaliação da estabilidade dos antígenos sobre a membrana de nitrocelulose.....	43
3.3. Tratamento de soros com gama-globulina agregada.....	44
4. Análise do desempenho diagnóstico dos testes.....	44
5. Análise estatística.....	45
6. Caracterização dos antígenos das formas amastigotas (As e At) e epimastigotas (Es e Et) por "Immunoblotting".....	45
6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)....	45
6.2. Preparações antigênicas.....	46
6.3. "Immunoblotting".....	46
RESULTADOS.....	48
1. Reação de imunofluorescência indireta com a forma amastigota do <i>T.cruzi</i> (IFI-A) para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <u>Trypanosoma cruzi</u>	48
2. Padronização da técnica de Dot-ELISA para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA anti- <u>Trypanosoma cruzi</u>	49
3. Determinação do limiar de reatividade (LR) e dos índices avaliadores dos testes.....	52
4. Índices avaliadores do desempenho diagnóstico das técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA.....	68
5. Positividade em técnicas qualitativas de IFI (E e A) e Dot-ELISA (As e At) para anticorpos IgG, IgM e IgA.....	70

6. Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA detectados nas técnicas de Dot-ELISA com diferentes tipos de antígenos de <u>Trypanosoma cruzi</u>	73
7. Avaliação estatística da capacidade discriminativa entre pacientes chagásicos e não chagásicos, das técnicas de IFI-A e Dot-ELISA (As, At e Es) em relação à IFI-E, através dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA.....	75
8. Correlação entre os títulos de anticorpos observados nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.....	80
9. Reprodutibilidade da técnica de Dot-ELISA (Dot-As).....	87
10. Estabilidade dos antígenos em membrana de nitrocelulose na técnica de Dot-ELISA.....	89
11. Caracterização preliminar dos polipeptídeos de formas amastigotas e epimastigotas do T.cruzi reconhecidos por soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos por "immunoblotting".....	91
ANEXOS.....	94
DISCUSSÃO.....	108
CONCLUSÕES.....	124
RESUMO.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanosomíase americana causada pelo Trypanosoma cruzi é endêmica nas zonas rurais da América Central e do Sul e a sua distribuição está associada principalmente à presença de vetores e às condições sócio-econômicas da população.

Ainda sem tratamento eficaz, a profilaxia desta doença é efetuada mediante o combate de vetores, porém a sua erradicação está longe de ser conseguida.

Atualmente, estima-se que a doença em toda América Latina atinja 24 a 25 milhões de pessoas, e que cerca de 65 milhões vivam em áreas endêmicas, sujeitas ao risco da infecção (HAYES & SCHOFIELD, 1990).

No Brasil, em torno de 5 a 6 milhões de pessoas encontram-se provavelmente infectadas, e pelo menos 25 milhões destas estejam sujeitas ao risco direto de contraírem a doença (DIAS, 1987; MONCAYO-MEDINA, 1987).

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário digenético, pertencente a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae; tem o ciclo evolutivo envolvendo alternativamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado hematófago da família Reduviidae.

O ciclo de vida do Trypanosoma cruzi no hospedeiro invertebrado inicia-se quando reduvidios hematófagos do gênero Triatoma, Panstrongylus ou Rhodnius, se infectam ao ingerirem formas tripomastigotas presentes no sangue circulante de vertebrados infectados. No intestino médio dos insetos, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas; formas estas dotadas de mecanismos de multiplicação, que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, no reto dos insetos. Estas últimas, embora não se dividam, são infectantes para o hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos eliminados com as fezes do inseto podem penetrar no hospedeiro vertebrado pela mucosa ou por qualquer solução de continuidade na pele.

No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas atingem os tecidos locais, ou através da corrente sanguínea, os tecidos distantes, e após a sua penetração nas células se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas, multiplicam-se por divisões binárias, transformam-se em tripomastigotas que são liberados no sangue circulante após o rompimento das células.

A transmissão natural da infecção através dos vetores invertebrados constitui o mais importante mecanismo de manutenção da doença nas zonas mais endêmicas, tanto para o homem, como para os animais domésticos e silvestres.

Outra importante forma de transmissão da doença é a via por transfusão sanguínea, que atualmente possibilita a

expansão da doença nos grandes centros urbanos, em decorrência de doadores de sangue serem com frequência migrantes infectados oriundos de zonas endêmicas. No Brasil, estima-se que cerca de 10.000 a 20.000 pessoas por ano estejam sujeitas ao risco de infecção transfusional (DIAS & BRENER, 1984; SHIKANAI-YASUDA et alii, 1990).

Outra forma de transmissão da doença é a congênita, onde se estima que 1% dos recém-nascidos podem nascer infectados, quando as mães são portadoras da infecção chagásica (DIAS, 1987).

Outras vias de transmissão de menor importância epidemiológica podem ocorrer através de transplante de órgãos e por acidentes laboratoriais (CHOCAIR et alii, 1981; DIAS, 1987).

Manifestações clínicas da doença de Chagas, no homem e nos demais vertebrados susceptíveis, são caracterizadas por duas fases distintas: aguda e crônica.

A fase aguda da doença apresenta intensidade e duração variável, em média de 2 a 4 meses, que frequentemente passa despercebida nos adultos. Esta fase caracteriza-se por parasitismo tecidual intenso, parasitemia no sangue circulante, hepato-esplenomegalia e hipertrofia de linfonodos. O parasitismo é acompanhado de inflamação, destruição de células nos tecidos e posterior fibrose (RASSI, 1979). Com o estabelecimento de uma resposta imune eficiente, o número de parasitas teciduais e circulantes são

reduzidos e os processos inflamatórios e degenerativos regridem, conferindo resistência ao hospedeiro (KRETTLI, 1983).

A fase crônica persiste durante toda a vida, sem cura espontânea ou processos de reagudização. Caracteriza-se por um parasitismo sub-patente, tendo raras formas circulantes ou teciduais (BRENER, 1980).

De acordo com os sintomas clínicos apresentados, a fase crônica é classificada nas formas crônicas indeterminada, cardíaca e digestiva.

A infecção chagásica crônica indeterminada tem grande importância epidemiológica nas áreas endêmicas, onde geralmente é a forma encontrada em mais da metade dos indivíduos infectados. Esta forma se caracteriza por longo período assintomático compreendido entre o final da fase aguda e estabelecimento de outras formas sintomáticas. De acordo com recentes dados da OMS (MONCAYO-MEDINA, 1987), a maioria dos pacientes chagásicos não apresentam sintomas clínicos da doença, podendo sobreviver em aparente equilíbrio com o parasita, fato comprovado pela observação de indivíduos em áreas endêmicas, com mais de 70 anos (LARANJA et alii, 1956; MACEDO, 1980; PRATA & MACEDO, 1984; DIAS, 1989). Cerca de 10 a 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca da doença e 3% a forma digestiva.

Estudos longitudinais realizados entre diferentes áreas endêmicas do Brasil revelam que pacientes, com idades

entre 10 a 20 anos evoluem mais facilmente para forma crônica cardíaca, podendo atingir a cifra de 30 a 50% (COURA & PEREIRA, 1984; MACEDO, 1980).

A forma crônica cardíaca é comumente encontrada em indivíduos entre 20 a 50 anos de idade, geralmente 10 a 30 anos após a fase aguda. Os pacientes apresentam quase sempre comprometimento cardíaco quando submetidos ao exame clínico e laboratorial (PRATA & MACEDO, 1984).

Sintomas clínicos mais frequentes da forma crônica cardíaca são: palpitação, dispnéia de esforço, edema dos membros inferiores, dor precordial e insuficiência cardíaca. Os exames do coração revelam principalmente arritmias, bradicardia, sopro sistólico mitral e congestão sistêmica venosa. Eletrocardiogramas mostram com maior frequência alterações com bloqueio completo do ramo direito, bloqueio incompleto do ramo direito, bloqueio isolado do ramo esquerdo, bloqueio atrio-ventricular e bloqueio bilateral dos dois ramos (AMORIM et alii, 1979).

A forma crônica digestiva acomete cerca de 3 a 9% dos pacientes crônicos infectados pelo Trypanosoma cruzi, apresentando frequentemente alterações digestivas isoladas ou associadas do megaesôfago e megacolon (COURA et alii, 1979; CASTRO et alii, 1984; REZENDE, 1979, 1984).

Sintomas clínicos encontrados na maioria dos pacientes com esta forma são: disfagia, dor esofágica, regurgitação, pirose, tosse, obstipação, dor abdominal e constipação intestinal.

Nas primeiras semanas da infecção chagásica, são observadas evidências da resposta imune, tanto celular como humoral.

A resposta imune, do tipo humoral pode ser verificada indiretamente pelos altos níveis de IgM total que ascendem paralelamente com a parasitemia, tanto nas infecções naturais como acidentais (LELCHUK et alii, 1970; VATTUONE et alii, 1973). Enquanto que na fase crônica, os níveis de IgM total apresentam-se normais (SCHMUNIS et alii, 1978).

Incluem-se nestas imunoglobulinas M os anticorpos anti-Trypanosoma cruzi, e portanto a detecção destes anticorpos torna-se extremamente importante no diagnóstico das formas congênicas da infecção chagásica (SZARFMAN et alii, 1973), bem como das formas agudas sem sintomas. Nas infecções agudas por transfusão sanguínea, os anticorpos IgM aparecem nos primeiros dias e declinam rapidamente, quando o tratamento é eficaz (CAMARGO & LESER, 1974; ISRAELSKI et alii (1988); SHIKANAI-YASUDA et alii, 1990). Predominância de anticorpos IgM nas infecções chagásicas agudas foi verificada pela imunofluorescência indireta (CAMARGO & AMATO NETO, 1974).

As imunoglobulinas totais da classe IgG podem ser também detectadas nas primeiras semanas pós-infecção e seus níveis permanecerem elevados durante a infecção crônica, sem aparentes flutuações.

Os anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi são facilmente detectados em altos títulos na maioria dos pacientes tratados durante a fase crônica, mesmo em casos com xenodiagnóstico repetidamente negativos (CERISOLA, 1977).

Os níveis totais de imunoglobulinas IgA apresentam-se normais em pacientes nas fases aguda e crônica da doença (LELCHUK et alii, 1970) ou aumentados em alguns pacientes na fase aguda (SCHMUNIS et alii, 1978) e em pacientes com a forma crônica digestiva (SÁ-FERREIRA et alii, 1983).

Os anticorpos IgA anti-Trypanosoma cruzi também foram detectados pela imunofluorescência indireta em alguns pacientes na fase aguda e em pacientes com a forma crônica digestiva (PRIMAVERA et alii, 1988).

Enquanto que os níveis de IgE total encontrados em pacientes chagásicos crônicos não tratados foram semelhantes aos de indivíduos não infectados (GUELLER et alii, 1978).

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas pode ser feito por métodos parasitológicos e sorológicos.

Na fase aguda, quando a parasitemia é elevada, o método parasitológico é comumente empregado, pesquisando-se o parasita no sangue total ou no creme leucocitário dos pacientes. Contudo, nas formas crônicas, devido ao número extremamente baixo de parasitas, faz-se necessário a utilização de métodos que permitam a sua multiplicação, tais como o xenodiagnóstico e a hemocultura. O xenodiagnóstico,

método parasitológico de maior preferência, embora específico, pode detectar, segundo alguns autores, apenas 20 a 40% dos casos sorologicamente positivos (SALGADO et alii, 1970; FISTEN & CHOWDHURY, 1980), mesmo após suas exaustivas repetições.

As dificuldades encontradas no diagnóstico parasitológico da infecção crônica, devido à raridade de parasitas circulantes, tornam o diagnóstico sorológico extremamente importante para o diagnóstico da doença de Chagas.

Embora os métodos sorológicos forneçam evidências indiretas de infecção chagásica, proporcionam inestimáveis informações quanto à sua prevalência e incidência nas populações, permitem triagem de doadores de sangue, além de diagnóstico individual de pacientes suspeitos.

Os métodos sorológicos mais comumente utilizados no diagnóstico da doença de Chagas são: reação de fixação do complemento, hemaglutinação passiva, aglutinação direta, floculação, aglutinação por látex e as técnicas com anticorpos marcados, tais como as reações de imunofluorescência indireta e imunoenzimática (CAMARGO & TAKEDA, 1979; CAMARGO, 1987).

Reação de fixação do complemento

A reação de fixação do complemento, descrita em 1913 por GUERREIRO & MACHADO, é ainda amplamente utilizada no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Apresenta sensibilidade e especificidade satisfatórias quando executada adequadamente (PELLEGRINO, 1954; BATISTA & SANTOS, 1959). Os resultados divergentes ocorrem quando se utilizam diferentes extratos antigênicos (extrato total, extrato deslipidado), tempo e temperatura de incubação, concentração de hemolisina e volume dos reativos, ou quando executado por pessoal de nível técnico não qualificado (PRATA et alii, 1975; SIQUEIRA, 1964). Ademais, apresenta reações falso-positivas com leishmanioses visceral e tegumentar e, resultados inconclusivos devido à intensa atividade anticomplementar dos soros.

Reação de hemaglutinação passiva

A reação de hemaglutinação passiva foi descrita em 1961 por Romãna, utilizando-se como suporte hemácias frescas de carneiro. A divulgação da reação de hemaglutinação para fins de rotina diagnóstica teve como fator limitante a instabilidade dos reagentes preparados com hemácias frescas. Atualmente, pela sensibilização de hemácias previamente fixadas por tratamento aldeídico, são possíveis de serem obtidos reativos estáveis, que quando rigorosamente

padronizado fornecem resultados de alta confiabilidade (HOSHINO-SHIMIZU et alii, 1978). Os resultados apresentam sensibilidade e especificidade comparáveis aos da reação de fixação do complemento e imunofluorescência (CERISOLA, 1970; NEAL & MILES, 1970; CAMARGO & HOSHINO-SHIMIZU, 1974). Apresenta reações cruzadas com leishmaniose, mononucleose e pênfigo (CAMARGO et alii, 1975a). De execução simples e rápida, permite a leitura dos resultados dentro de 1 hora. A reação de hemaglutinação passiva pode ser realizada em microplacas e com amostras de sangue colhidas em papel de filtro. Além disso, pode ser automatizada para uso em grande escala. O controle de qualidade de sucessivas partidas do reagente de hemaglutinação, baseadas na análise sequencial e no sistema de "chart-control", pode assegurar a reprodutibilidade do teste (HOSHINO-SHIMIZU et alii, 1986).

Reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta para doença de Chagas foi descrita pela primeira vez por FIFE & MUSCHEL em 1959, e posteriormente modificada por VOLLER (1963) e CAMARGO (1966). A técnica é de execução simples, econômica e de fácil padronização. A utilização de uma única partida do parasita formolizado possibilita a obtenção de antígeno homogêneo, reprodutível e suficiente para o processamento de milhares de testes. A reação pode ser executada com soro ou plasma e com eluatos de sangue colhido em papel de filtro. O

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

emprego de conjugados fluorescentes de boa procedência e imunoquimicamente definidos, como anti-IgG específico para cadeia gama da imunoglobulina, evita a interferência de "anticorpos naturais" da classe IgM, responsáveis por resultados falso-positivos. A utilização do conjugado anti-IgM possibilita diagnosticar a infecção aguda da doença de Chagas. No entanto, falsos resultados positivos podem ocorrer na concomitância de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi e IgM antiglobulínicos (fator reumatóide). Estes últimos podem ser removidos facilmente, tratando o soro previamente com gama-globulina agregada (CAMARGO et alii, 1972). A pouca divulgação desta técnica para fins de rotina sorológica se deve ao elevado custo do equipamento de microscopia fluorescente. Atualmente, com a utilização de lâmpadas de halogênio, ao invés dos dispendiosos bulbos de mercúrio, torna o teste acessível a maioria dos laboratórios de rotina e a bancos de sangue. A reação de imunofluorescência é altamente sensível, sendo mesmo a que mais precocemente se positiva nas infecções agudas (CERISOLA et alii, 1970). Todavia, a especificidade do teste é comprometida pelas reações cruzadas com leishmanioses. Estas, por sua vez, podem ser contornadas por processos de absorção seletiva ou de inibição de anticorpos com sistema antigênico de grupo (CAMARGO & REBONATO, 1969).

Reação de aglutinação direta

A detecção de anticorpos aglutinantes no soro de pacientes chagásicos foi descrita pela primeira vez por PACKCHANIAN, (1935) e posteriormente por MUNIZ & FREITAS, (1944). Entretanto, as suspensões utilizadas como reagentes não eram estáveis e apresentavam tendência a auto-aglutinação. Somente em 1971, VATTUONE & YANOVSKY desenvolveram uma microtécnica, utilizando como reagente, suspensões de formas epimastigotas formolizadas e tripsinizadas. O reagente é estável, sendo altamente sensível para detecção de infecções chagásicas agudas e pouco sensível na detecção de infecções crônicas. O uso de 2-mercaptoetanol no tratamento dos soros permite distinguir entretanto formas agudas das crônicas (VATTUONE et alii, 1973). Contudo, o teste de aglutinação apresenta reações cruzadas com soros de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar.

Reação de floculação

A reação de floculação, descrita por HOSHINO-SHIMIZU et alii (1975), utiliza o próprio parasita fragmentado como reagente. As partículas de epimastigotas formolizadas obtidas por fragmentação ultra-sônica são preservadas por liofilização, podendo permanecer estável por mais de três meses a 4 °C, após a sua reconstituição com água destilada.

Apresenta sensibilidade comparável à reação de fixação do complemento, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta (CAMARGO et alii, 1975b; CAMARGO et alii, 1977). Apesar de ser um teste altamente sensível na detecção de infecções agudas, apresenta resultados falso-positivos com paracoccidiodomicose, toxoplasmose, hepatite e leishmaniose cutânea (HOSHINO-SHIMIZU et alii, 1975) e elevados índices de positividade com leishmaniose visceral (AMATO NETO et alii, 1976). De execução simples e com reagente estável, o teste de floculação é adequado para fins de rotina em bancos de sangue e inquéritos epidemiológicos. Contudo, é de uso limitado, devido ao alto consumo de parasitas necessários para produção do reagente.

Reação de hemaglutinação rápida

Esta técnica, descrita por KNIERIM & RUBINSTEIN (1970), utiliza como reagente hemácias frescas de carneiro a 10%, sensibilizadas com extratos do parasita. Apresenta sensibilidade similar à da reação de hemaglutinação passiva e superior à da reação de fixação do complemento. Entretanto, torna-se inadequada para fins de rotina, devido à duração limitada do reagente e a variabilidade antigênica que podem ocorrer entre sucessivas partidas. As tentativas

feitas com o uso de hemácias preservadas não foram bem sucedidas, pois apresentam sensibilidade inferior à reação de imunofluorescência indireta e a leitura dos resultados mostram aglutinações com menor intensidade e nitidez (CAMARGO et alii, 1973).

Reação de látex

A reação de látex utiliza como reagente partículas de poliestireno adsorvidas com extratos do parasita. O teste é simples e de rápida execução. Entretanto, o reagente é pouco estável e pode se deteriorar em períodos variáveis de tempo. Alguns autores encontraram sensibilidade comparável a da fixação do complemento, da hemaglutinação passiva e da imunofluorescência indireta (ENDERS et alii, 1975; PELLEGRINO & KATZ, 1971). Entretanto, outros autores encontraram baixa sensibilidade ou reatividade variável entre diferentes partidas de reagentes comerciais (BARUFFA & ALCANTARA FILHO, 1975; KNIERIM et alii, 1971). Além disso, constatou-se alta incidência de reações inespecíficas (KNIERIM et alii, 1971). Resultados comparáveis a outros testes e com menor inespecificidade foi encontrado com a utilização de um reagente de origem argentina, estável por mais de um ano (CERISOLA et alii, 1980).

TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS

1- Reação imunoenzimática

Esta técnica é semelhante à reação de imunofluorescência, diferindo na substituição dos anticorpos marcados com fluorocromos, por anticorpos marcados com enzimas, tais como a peroxidase. Apresenta sensibilidade e especificidade similares à reação de imunofluorescência (FERREIRA et alii, 1975) e tem como vantagem a efetuação da leitura em microscópio óptico comum.

2 - ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A técnica de ELISA, descrita por VOLLER em 1975, apresenta alta sensibilidade e especificidade quando comparada à reação de imunofluorescência (FERREIRA et alii, 1977; CAMARGO et alii, 1979). Nesta técnica, emprega-se como suporte tubos ou placas plásticas onde os antígenos são adsorvidos. Pode-se utilizar vários tipos de antígeno, como por exemplo suspensões de parasitas, extratos ou ainda frações altamente purificadas. As placas podem ser previamente sensibilizadas e guardadas prontas para o uso. A leitura é feita por espectrofotometria, que permite não somente a obtenção de resultados quantitativos, como também

a automação da técnica. Embora as vantagens apresentadas pela técnica de ELISA sejam múltiplas, a sua aplicação para fins de rotina de diagnóstico encontra obstáculos, principalmente em países em desenvolvimento, devido ao alto custo das placas de poliestireno e do equipamento de leitura.

3 - Dot-ELISA (Dot-enzyme-linked immunosorbent assay)

Dot-ELISA foi descrita pela primeira vez por KAFATOS (1979), em hibridização de DNA, denominando-a de "dot hybridization". HAWKES (1982) aplicou esta técnica na triagem de anticorpos monoclonais, utilizando um 2º anticorpo marcado com isótopo radioativo e a designou de "dot immunobinding". PAPPAS et alii (1983) descreveram a técnica para aplicação no diagnóstico de leishmaniose visceral com a denominação de Dot-ELISA. A técnica tem sofrido modificações e nomes de acordo com o sistema utilizado. Para fins de diagnóstico, tem-se adotado o termo Dot-ELISA, em função do princípio da reação ser semelhante ao da técnica de ELISA, com a diferença de que na primeira, utilizam-se membranas de nitrocelulose, como suporte sólido. Dot-ELISA tem sido utilizada no diagnóstico de várias doenças parasitárias (leishmaniose, schistosomíase, fasciolíase, hidatidose, malária), bacterianas (Escherichia coli e Vibrio cholerae) e virais (Varicela-

zoster), e os resultados apresentados mostraram-se bastante promissores (SEIDLIN et alii, 1984; BEAUTIN et alii, 1984; GUIMARÃES et alii, 1986; ZHENG et alii, 1986; BOCTOR et alii, 1987; LONDNER et alii, 1987; JAFFE & ZALIS, 1988; SHAHEEN et alii, 1989). A utilização desta técnica no diagnóstico sorológico da doença de Chagas foi feita por FLINT et alii (1984) e ARAÚJO (1985), e os resultados preliminares foram bastante satisfatórios. Posteriormente foi melhor avaliada por DE HUBSCH et alii (1988, 1989), utilizando como antígeno, suspensões formolizadas e extrato citoplasmático de epimastigotas. Dot-ELISA é de consenso geral de que sua execução é simples, rápida e reproduzível. A leitura pode ser feita visualmente, dispensando o uso de equipamento. Além disso, o antígeno pode ser distribuído sobre a membrana e conservado durante meses a 4 °C, sem perda da reatividade.

Os métodos sorológicos em geral, quando executados com o rigor técnico necessário e com reagentes adequados, apresentam sensibilidade e especificidade satisfatórias para fins de diagnóstico. Entretanto, não é possível, comprovar ou excluir com segurança a presença da infecção chagásica, uma vez que os resultados são interpretados em termos de probabilidade.

Os resultados falso-negativos em bancos de sangue podem ocasionar posteriormente infecções pós-transfusionais, enquanto que resultados falso-positivos podem acarretar sérias implicações pessoais e sociais ao paciente (CAMARGO, 1972).

Portanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que sejam sempre realizados, no mínimo, dois testes diferentes em paralelo, para obtenção de resultados sorológicos mais precisos, sobretudo em se tratando de triar os doadores de sangue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1975).

A avaliação de níveis de anticorpos, através de reações quantitativas, não apresenta grande interesse clínico ou diagnóstico, pois os títulos não se correlacionam com a presença ou gravidade das manifestações clínicas. Todavia, para o seguimento de pacientes com infecção recente submetidos ao tratamento, os níveis de anticorpos são clinicamente significativos.

A presença dos antígenos solúveis na urina e antígenos circulantes em soros de pacientes com infecção chagásica aguda e congênita (FREILIJ et alii, 1987), assim como de antígenos solúveis em soros de pacientes na fase crônica (ARAÚJO et alii, 1981b) e de complexos antígeno-anticorpo medidos especificamente através de métodos imunoenzimáticos (MARCIPAR et alii, 1982) poderão ser extremamente úteis no diagnóstico da doença. Estes métodos poderão assegurar melhor o diagnóstico, pela presença dos

componentes antigênicos do parasita nos fluídos orgânicos e não apenas pela resposta humoral demonstrada na sorologia.

Os vários métodos sorológicos mencionados para a pesquisa de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi são realizados com antígenos obtidos de formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi cultivados em meios acelulares, previamente fixados, ou com seus componentes extraídos por diferentes métodos (CAMARGO & TAKEDA, 1979).

A preparação destes antígenos geralmente resulta em antígenos totais, que conseqüentemente propiciam o aparecimento de reações cruzadas (VOLLER & DE SAVIGNY, 1981).

Para solucionar o problema da reatividade cruzada existente entre antígenos de Trypanosoma cruzi e outras infecções não chagásicas, muitos pesquisadores empreenderam na identificação de frações antigênicas específicas do parasita e sua subsequente purificação.

AFCHAIN et alii (1978, 1979), por exemplo, identificaram um componente específico do parasita, denominado de Fração 5, através de imunoeletroforese da fração aquosa do epimastigota do Trypanosoma cruzi.

OROZCO et alii (1984) por sua vez mediante a produção de diversos monoclonais determinaram que a glicoproteína de 72 kDa de epimastigotas correspondia ao antígeno específico presente na referida fração 5. Contudo, nesta fração 5, componentes glicoproteicos de 90 kDa foram também identificados por Scott et alii (1984).

Esta fração de 90 kDa foi avaliada na sorologia para doença de Chagas por SCHECHTER et alii (1985), obtendo-se resultados altamente sensíveis, no entanto apresentou reatividade cruzada com 10% dos pacientes leishmanióticos.

SCHARFSTEIN et alii (1983, 1985, 1986) isolaram a fração GP 25, a partir do fracionamento do sobrenadante antigênico de epimastigotas em coluna de Bio-Gel P-10. Em um total de 567 soros testados com a fração GP 25, sendo 321 soros de pacientes chagásicos, encontraram 97,8% de positividade. A reatividade cruzada, em 85 soros de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar testados, foi verificada em 1 paciente com leishmaniose visceral. GP 25 é um produto da clivagem da glicoproteína de PM 51/57 kDa e pode ser encontrada na superfície de epimastigota e tripomastigota sanguícolas.

Uma outra maneira de conferir especificidade diagnóstica, mesmo com o emprego de misturas antigênicas complexas, seria através da utilização de outras formas parasitárias do Trypanosoma cruzi.

PRIMAVERA et alii (1990) em revisão realizada sobre antígenos utilizados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas constatou que 84% da literatura tratava sobre formas epimastigotas, enquanto que somente 9% eram sobre formas tripomastigotas e 7%, sobre formas amastigotas.

Em relação aos antígenos tripomastigotas, DRAGON et alii (1985) isolaram polipeptídeos de 90 kDa através do fracionamento com lectina de Lens culinaris, e não sendo encontrada reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose.

KRETTLI (1982) por sua vez demonstrou a importância das formas tripomastigotas no controle de cura e monitoramento de pacientes chagásicos crônicos, para a detecção de anticorpos líticos em presença de complemento.

Formas amastigotas de diferentes origens têm sido investigadas por vários autores. Assim, COSSIO et alii (1983, 1985) ao utilizarem, como substrato, cortes histológicos de formas amastigotas do músculo esquelético de camundongos Rockland infectados, na reação de imunofluorescência indireta, encontraram maior sensibilidade se comparadas com a forma epimastigota.

PRIMAVERA et alii (1990) estudaram também formas amastigotas obtidas "in vivo", ou seja de baço de camundongos infectados, na reação de imunofluorescência indireta, e verificaram sua alta reatividade em relação à forma epimastigota.

Quanto às formas amastigotas obtidas "in vitro", os resultados foram semelhantes, pois CERISOLA et alii (1971), ao empregarem na reação de imunofluorescência indireta, formas amastigotas de cultivo em células HeLa, notaram sensibilidade superior à forma epimastigota.

Da mesma maneira, GAM & NEVA (1977) observaram pela reação de fixação do complemento que antígenos constituídos de misturas das formas amastigotas e tripomastigotas obtidas em cultivo de células de pele e músculo de embrião humano eram mais sensíveis que os de epimastigotas.

Entretanto, para UMEZAWA et alii (1980), as formas amastigotas e tripomastigotas obtidas em cultivo de células LLC-MK₂ na reação de imunofluorescência indireta não apresentaram diferenças significativas de reatividade em relação à forma epimastigota.

Por outro lado, para ARAÚJO & GUPTILL (1984), a alta reatividade das formas amastigotas obtidas em cultivo de células L929 nas técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA foi verificada em quase a metade dos pacientes chagásicos, quando expressa em títulos e níveis quantitativos de anticorpos, em relação à forma epimastigota.

Como acima mencionado, as formas amastigotas empregadas no diagnóstico sorológico da doença de Chagas foram obtidas "in vivo" pela inoculação em animais susceptíveis e "in vitro" pela utilização de diferentes linhagens de células.

Entretanto, avaliação mais precisa da forma amastigota obtida "in vivo" para fins de diagnóstico foi realizada por PRIMAVERA et alii (1990), na reação de IFI.

Em virtude do fato de que a obtenção das formas amastigotas de cultivo "in vitro" requerer procedimentos menos laboriosos do que as das formas obtidas "in vivo", como também das discrepâncias observadas entre os autores quanto à sua reatividade, incentivou-nos a investigar melhor as características diagnósticas deste antígeno, quando aplicado em técnicas sorológicas para doença de Chagas.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

- Padronizar as técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Dot-ELISA utilizando como antígeno as formas amastigotas do Trypanosoma cruzi.

- Determinar as classes de anticorpos envolvidas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA utilizando respectivamente antígeno formolizado assim como, antígenos solúvel e total da forma amastigota do Trypanosoma cruzi.

- Avaliar o desempenho diagnóstico das técnicas de IFI e Dot-ELISA com a forma amastigota em relação à técnica convencional de IFI, com a forma epimastigota do Trypanosoma cruzi.

- Determinar a existência ou não de correlação entre as técnicas de IFI e Dot-ELISA com os antígenos das formas amastigota e epimastigota do Trypanosoma cruzi.

- Caracterizar preliminarmente os antígenos das formas amastigota e epimastigota do Trypanosoma cruzi utilizados no diagnóstico, pela técnica de "Immunoblotting".

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTIVO E OBTENÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO TRYPANOSOMA CRUZI, CEPA Y

1.1. Epimastigota (E)

As formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi, cepa Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953), foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) durante 7 dias em estufa a 28 °C (CAMARGO, 1964; FERNANDES & CASTELLANI, 1966). Na fase exponencial de crescimento, quando somente formas epimastigotas são observadas, os parasitas foram lavados (3 vezes) por centrifugação (8.000 rpm, 15 minutos) em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2; NaCl 0,15 M (PBS).

Os parasitas foram imediatamente utilizados na preparação dos antígenos para a reação de Imunofluorescência Indireta, conservados em alíquotas de 5×10^8 a -70 °C ou mantidos a 4 °C liofilizados.

1.2. Amastigota (A)

As formas amastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas com o Trypanosoma cruzi, conforme previamente descrito por Umezawa (1975).

A linhagem de células LLC-MK₂ (células epiteliais renais de macaco Rhesus - Macaca mulata), proveniente do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foi cultivada a 37 °C. As células foram infectadas inicialmente com 10⁶ tripomastigotas provenientes do sangue de camundongos infectados com o Trypanosoma cruzi, em meio de Eagle contendo 2% de soro fetal bovino. A reinfecção de outras garrafas foi feita semanalmente com formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante da cultura celular.

As formas amastigotas do Trypanosoma cruzi foram obtidas do sobrenadante do cultivo celular a partir do 8^o - 9^o dias de infecção, sendo colhidas diariamente até o 13^o dia.

Os amastigotas, presentes no sobrenadante, foram centrifugados a 8.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, e as formas tripomastigotas contaminantes, eliminadas pela centrifugação a 3.000 rpm por 2 minutos. O sedimento contendo as formas amastigotas foram lavadas 3 vezes em PBS (8.000 rpm, 15 minutos) e imediatamente preparadas para serem utilizadas na reação de Imunofluorescência Indireta ou conservadas em alíquotas de 5 x 10⁸ a -70 °C.

Alguns lotes de formas amastigotas foram obtidos do laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da USP, cedidos pela Dra. Maria Júlia Manso Alves.

Todos os lotes de formas amastigotas foram rotineiramente examinados visualmente, após as lavagens, em microscópio óptico e ao mesmo tempo observados após coloração com Giemsa.

2. AMOSTRAS DE SOROS

Foram testadas 223 amostras de soros pelas técnicas de Imunofluorescência Indireta (A e E) e Dot-ELISA (As e At) e 68 amostras de soros pela técnica de Dot-ELISA (Es).

Os soros foram obtidos de indivíduos chagásicos com diferentes formas clínicas; de não chagásicos sem manifestação clínica de outras afecções; e de outras patologias.

2.1. Soros Padrões

O soro padrão positivo foi obtido do plasma de doadores do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com sorologia positiva para Doença de Chagas. O soro foi obtido do plasma inativado a 56 °C por 30 minutos, seguido de congelamento, descongelamento, centrifugação e mantido liofilizado.

O soro padrão negativo foi obtido da rotina de laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

Todos os soros foram submetidos aos novos testes sorológicos no laboratório após inativação (56 °C por 30 minutos) e conservados em alíquotas a -70 °C.

2.2. Soros de pacientes chagásicos

As 120 amostras de soros de pacientes chagásicos foram classificadas de acordo com a evolução da doença em: fase aguda e crônica (Tabela I).

Fase aguda

As amostras de soros de pacientes da fase aguda da doença de Chagas foram doadas pela Dra Maria Aparecida Shikanai-Yasuda, do Hospital das Clínicas - USP.

Este grupo consistiu de 10 amostras de soros de pacientes na fase aguda da infecção, confirmados pela presença de anticorpos IgM e xenodiagnóstico positivo.

Fase crônica

Este grupo consistiu de 110 amostras de soros de pacientes crônicos, doados pelo Dr Hélio Iwao Nakamura, do ambulatório do Serviço Social da Indústria (SESI). Os pacientes foram submetidos a exames clínicos, laboratoriais e eletrocardiográficos, todos apresentando sorologia

positiva nas reações de fixação do complemento (FC), hemaglutinação passiva (HP) e imunofluorescência indireta (IFI). De acordo com o exame eletrocardiográfico foram classificados clinicamente em forma : crônica indeterminada, cardíaca e digestiva.

Forma crônica indeterminada - Este grupo consistiu de 50 amostras de soros de pacientes que apresentavam eletrocardiograma normal e sorologia positiva para doença de Chagas

Forma crônica cardíaca - Este grupo consistiu de 50 amostras de soros de pacientes que apresentavam eletrocardiograma alterado e sorologia positiva para doença de Chagas.

Forma crônica digestiva - Este grupo consistiu de 10 amostras de soros de pacientes que apresentavam distúrbios digestivos e sorologia positiva para doença de Chagas, 2 das quais, os pacientes apresentavam distúrbios digestivos associados à alterações eletrocardiográficas, porém sem achados radiológicos comprovados.

2.3. Soros de indivíduos normais

Foram estudadas 71 amostras de indivíduos com sorologia negativa para doença de Chagas, provenientes do ambulatório do SESI, sendo distribuídos da seguinte maneira (Tabela I):

- 49 amostras de soros de indivíduos clinicamente sadios, com eletrocardiograma normal e sorologia negativa .
- 3 amostras de soros de indivíduos com eletrocardiograma alterado e sorologia negativa .
- 19 amostras de soros de indivíduos sorologicamente não chagásicos.

2.4. Soros de pacientes com outras etiologias

Foram analisadas 32 amostras de soros de pacientes com outras afecções não relacionadas à doença de Chagas, com sorologia positiva para os seus respectivos diagnósticos, mas negativos para doença de Chagas (IFI), assim distribuídos (Tabela I):

- 8 soros com leishmaniose visceral
- 4 soros com febre reumática
- 10 soros com sífilis
- 5 soros com doença auto-imune (fator anti-núcleo)
- 5 soros com malária

Os 8 soros de pacientes com Leishmaniose visceral foram também positivos na reação de IFI para doença de Chagas.

Tabela I - Amostras de soros de 223 pacientes chagásicos e não chagásicos.

Formas Clínicas	n ^o amostras		ECG*	Sorologia para doença de Chagas
Chagásicos:				
Aguda	10		ND	+
Crônica Indeterminada	50		normal	+
Crônica Cardíaca	50		alterado	+
Crônica Digestiva	10	8	normal	+
		2	alterado	+
Não chagásicos:				
Normais	71	49	normal	-
		3	alterado	-
		19	ND	-
Outras Infecções				
Leishmaniose visceral	8		ND	+
Febre Reumática	4		ND	-
Sífilis	10		ND	-
L.E.S.	5		ND	-
Malária	5		ND	-
TOTAL	223			

* ECG - Eletrocardiograma
 ND - não determinado

3. TESTES SOROLÓGICOS

3.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

3.1.1. Reagentes e soluções

- PBS-Tampão fosfato 0,01 M pH7,2 ; NaCl 0,15 M
- Azul de Evans 0,02mg/ml (p/v)
- Glicerina tamponada pH 9,5 (1ml de tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,5 M pH 9,5 e 9 ml de glicerina)

3.1.2. Preparo dos antígenos

a) Forma epimastigota do Trypanosoma cruzi (E)

As formas epimastigotas, utilizadas como antígeno na IFI, foram fixadas com uma solução de formaldeído a 2% (v/v) em PBS, por 18 horas à temperatura ambiente. Os parasitas foram lavados duas vezes em PBS, ressuspensos no mesmo tampão e distribuídos em lâminas de vidro especial para imunofluorescência (aproximadamente 100 parasitas por campo de microscópio, 400x). Após a secagem, 10 minutos a 37 °C, as lâminas foram acondicionadas e armazenadas a -70 °C.

b) Forma amastigota do Trypanosoma cruzi (A)

As formas amastigotas receberam tratamento semelhante à preparação do antígeno da forma epimastigota. Foram utilizadas somente preparações antigênicas que continham no máximo 5% de formas tripomastigotas contaminantes .

3.1.3. Diluições dos soros e conjugados fluorescentes

Os soros foram diluídos em PBS na razão 2, a partir de 1/5. Para a detecção dos anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi, os soros foram diluídos até 1:10.240 e para a detecção dos anticorpos IgM e IgA , a diluição final foi de 1:2.560.

Os conjugados fluorescentes utilizados na reação de IFI foram anti-IgG humano (cadeia gama - Biolab Mérieux), anti-IgM humano (cadeia μ - Hyland) e anti-IgA humano (cadeia alfa - Sigma), marcados com isotiocianato de fluoresceína.

A diluição ideal dos conjugados foi determinada por titulação em bloco, testando-se diluições crescentes do conjugado (1:100 a 1:1000) contra diluições crescentes do soro padrão positivo e negativo, tanto para IFI com formas amastigotas, como com epimastigotas do Trypanosoma cruzi.

O resultado foi expresso em títulos, correspondente ao inverso da diluição do soro.

3.1.4. Desenvolvimento do teste

A reação de Imunofluorescência Indireta foi executada, segundo a técnica descrita por CAMARGO (1966).

As lâminas de imunofluorescência contendo os antígenos foram secas à temperatura ambiente, antes de sua utilização.

Uma alíquota de 10 µl de cada diluição do soro foi depositada em cada área delimitada da lâmina e incubada em câmara úmida, por 30 minutos a 37 °C. As lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS (5 minutos cada) e secas com jatos de ar frio. A seguir, o conjugado, previamente titulado e diluído em azul de Evans, foi colocado em cada área delimitada da lâmina e incubado a 37 °C, durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas com glicerina tamponada pH 9,5.

As leituras das reações foram feitas em microscópio Zeiss, com iluminação epifluorescente, equipado com lâmpada de halogênio (100 watts/12 volts) e objetiva com aumento 40.

Em todos os testes foram incluídos diluições dos soros-padrão positivo e negativo. O título do soro foi considerado àquela diluição máxima ainda capaz de fornecer alguma reatividade no parasita.

3.2. "Dot-enzyme linked immunosorbent assay" (Dot-ELISA)

3.2.1. Reagentes e soluções

- Tris-NaCl- Tris(Sigma) 0,02M, pH 7,5; NaCl(Merck) 0,5M
- Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,5
- Solução bloqueadora - 5% de leite Mólico desnatado (Nestlé) em Tris-NaCl (p/v)
- Solução de lavagem -Tris-NaCl contendo 0,05% (v/v) de NP-40 (Sigma)
- Solução cromógena - 3 mg/ml de 4 cloro 1 naftol (Sigma) em metanol (Merck); 5 ml de Tris-NaCl e 5 µl de H₂O₂ a 30% (Merck)

3.2.2. Preparo dos antígenos

a) Antígeno solúvel (s)

Os antígenos solúveis das formas epimastigotas (Es) e amastigotas (As) do Trypanosoma cruzi foram preparados segundo a metodologia descrita por HOSHINO-SHIMIZU et alii (1978).

Os parasitas liofilizados foram pulverizados em um gral de porcelana e ressuspensos em água destilada para se obter uma concentração de 20 mg/ml. Em seguida, adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio 0,3 M (v/v) e a mistura foi lentamente macerada até a homogeneização completa. A

suspensão foi mantida sob agitação, durante 18 horas a 4 °C e depois neutralizada para pH 7,0, com ácido clorídrico 0,3 M. Após centrifugação (3000 rpm, 1 minuto, 4 °C), o sobrenadante foi dosado quanto ao seu conteúdo em proteínas. A estabilidade da suspensão foi preservada adicionando-se tioglicolato de sódio 1mg/ml (p/v) e timerosal 0,5mg/ml (p/v). O antígeno foi distribuído em alíquotas e armazenado a -70 °C.

b) Antígeno total (t)

O antígeno total de formas amastigotas do Trypanosoma cruzi (At) foi obtido por ultrasonicação (1,5 ampère, 1 minuto, em banho de gelo) do sedimento úmido de 6×10^9 parasitas/ml em água destilada. A suspensão obtida após 3 ultrasonicações foi isotonicada com uma solução de NaCl 0,3M (v/v) e novamente ultrasonicada. A suspensão antigênica final foi centrifugada (2.000 rpm, 1 minuto, 4 °C) e o sobrenadante conservado em alíquotas a -70 °C.

c) Antígeno lisado com detergentes

Inicialmente cerca de 6×10^9 amastigotas do Trypanosoma cruzi, ressuspensos em 1 ml de água destilada, foram submetidos à lise por congelamento e descongelamento (25 vezes). A suspensão, isotonicada com NaCl 0,3 M (v/v), foi posteriormente solubilizada com o emprego dos seguintes detergentes:

Nonidet-40 (NP-40) - Um volume da suspensão de parasitas (6 mg/ml) foi adicionado a 2 volumes de uma solução de 5% de NP-40 em Tris 0,02 M pH 7,5; e NaCl 0,5M (Tris-NaCl). A suspensão foi submetida a um banho fervente por 3 minutos e o produto solúvel obtido, utilizado como antígeno.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Um volume da suspensão de parasitas (6 mg/ml) foi adicionado a 2 volumes de SDS (30 µg/ml em tampão Tris-NaCl) e submetido a um banho fervente por 3 minutos. O produto solúvel final foi empregado como antígeno.

Desoxicolato de sódio (DOC) - A suspensão de parasitas (6 mg/ml) foi tratada com DOC nas concentrações de 0,25% a 3% em Tris-NaCl. A suspensão foi deixada durante 30 minutos a 4 °C, sendo depois empregada como antígeno.

A dosagem de proteínas, nos diferentes preparados antigênicos, foi efetuada empregando-se o método de LOWRY et alii (1951).

3.2.3. Conjugados enzimáticos

O conjugado anti IgG humano marcado com peroxidase foi preparado no próprio laboratório, e os conjugados anti-IgM humano (cadeia μ) e anti-IgA humano (cadeia alfa) foram obtidos comercialmente (Sigma Co).

Preparação do conjugado anti-IgG humano

O soro de cabra anti-IgG humana, cadeia gama específica (Sigma I-7883) foi marcado com peroxidase, tipo VI (Sigma), segundo a técnica de NAKANE & KAWAOI (1974).

Inicialmente 10 mg de peroxidase (atividade - 300 U/mg de enzima) foram dissolvidas em 2,5 ml de água destilada e oxidada com 0,5 ml de uma solução de metaperiodato de sódio 0,1M, recentemente preparada, por gotejamento. A mistura, após 20 minutos a temperatura ambiente, sob constante agitação foi dialisada por 18 horas a 4 °C, em tampão acetato de sódio 1 mM, pH 4,4 e a seguir alcalinizada para pH 9,0 com tampão carbonato 0,01M, pH 9,5.

Paralelamente, 2 ml de anti-IgG humana (10 mg/ml) foram dialisados em tampão carbonato 0,01 M pH 9,5. A enzima oxidada foi adicionada lentamente sobre a imunoglobulina dialisada e após 2 horas, à temperatura ambiente com agitação constante, adicionou-se 0,125 ml de boridreto de sódio na concentração de 4mg/ml (NaBH_4), mantendo-se ainda sob agitação lenta por mais 2 horas a 4 °C.

O conjugado, após diálise em PBS, foi purificado em cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-200 - Pharmacia) eluindo-o com o mesmo tampão. Os eluatos, em volumes de 1ml, foram dosados por espectrofotometria à 280 nm para dosagem de proteínas e a 403 nm, para a de enzima, peroxidase. Os eluatos, correspondentes ao 1º pico, foram concentrados em membrana de diálise recoberta com sacarose (4 °C) até a redução de 1:4 do seu volume inicial. Após a diálise em PBS, o conjugado foi conservado em glicerina neutra (v/v) a -20 °C.

Os conjugados foram titulados em bloco simultaneamente contra diferentes concentrações do extrato antigênico e diluições crescentes dos soros-padrão positivo e negativo, determinando-se assim a concentração ótima de antígeno e a diluição adequada do conjugado a serem empregadas.

3.2 4. Sensibilização da membrana de nitrocelulose

A concentração antigênica ideal para a reação de Dot-ELISA foi determinada por titulação em bloco, onde concentrações crescentes de antígeno foram ensaiadas contra diluições crescentes dos soros padrão, em uma diluição ótima do conjugado.

Para a técnica de Dot-ELISA, volumes de 1 µl da concentração ideal da suspensão antigênica foram aplicadas

sobre a membrana de nitrocelulose (0,45 µm - Millipore), utilizando-se um molde de acrílico (1 mm de espessura) contendo 96 orifícios perfurados, segundo o formato de uma placa de microtitulação.

Os antígenos foram fixados à membrana de nitrocelulose colocando-os em estufa a 37 °C, durante 15 minutos.

A membrana contendo os antígenos foi utilizada após bloqueio (2 horas, com agitação em solução bloqueadora) ou guardada em diferentes temperaturas para posterior teste da estabilidade do antígeno.

3.2.5. Diluições dos soros e conjugados enzimáticos

As amostras de soros e conjugados foram diluídos em solução bloqueadora com 1% de leite, em placas de poliestireno com fundo em U.

As amostras de soros foram diluídas na razão 2, a partir de 1:5 até 1:10.240 para detecção de anticorpos IgG, e até 1:2.560 para detecção dos anticorpos IgM e IgA.

Para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA, pelas técnicas de Dot-ELISA e "Imunoblotting", foram utilizados conjugados anti-cadeia específica humana marcada com peroxidase. A titulação do conjugado foi efetuada em bloco, testando-se paralelamente concentrações crescentes do

antígeno contra diluições crescentes dos soros-padrão positivo e negativo.

O título do conjugado foi determinado pela maior diluição do conjugado que, em determinada concentração de antígeno, fosse capaz de reagir com a maior diluição do soro padrão positivo, sem apresentar reação inespecífica com o soro negativo .

As diluições foram feitas antes de cada etapa da reação, a fim de evitar adsorção proteica das imunoglobulinas na superfície das placas de microtitulação.

3.2.6. Desenvolvimento do teste

A técnica de Dot-ELISA foi executada segundo a metodologia descrita por HAWKES et alii (1982), utilizando o sistema de BENNETT & YEOMAN (1983) e das modificações introduzidas por LISSALDO (1988).

A reação de Dot-ELISA foi executada em um sistema simples montado no próprio laboratório.

A membrana de nitrocelulose, contendo os antígenos e tratada com solução bloqueadora, foi colocada sobre uma placa de microtitulação, de modo que o antígeno ficasse em contacto com as diluições dos soros encontradas nas cavidades. A membrana foi então revestida com Parafilm, seguida de 5 folhas de papel Wathman nº 3 e por uma tampa de

acrílico, as quais foram fixadas à placa por meio de grampos metálicos.

Após uma hora de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes, 10 minutos cada, em solução de lavagem e incubada a seguir com o conjugado enzimático, durante 1 hora. Após novas lavagens, solução cromógena foi adicionada sobre a membrana por 5 minutos e lavada (6 vezes) em água destilada.

Em cada membrana foram incluídos os soros-padrão positivo e negativo.

A leitura da reação, expressa em títulos, foi efetuada após secagem das membranas entre folhas de papel de filtro. A reação foi considerada positiva quando ainda havia o desenvolvimento de uma coloração azul violácea, e negativa, na ausência desta coloração.

Todas as etapas foram efetuadas com agitação constante e à temperatura ambiente.

3.2.7. Avaliação da estabilidade dos antígenos sobre a membrana de nitrocelulose

Os antígenos das formas amastigotas As e At aplicados em membrana de nitrocelulose bloqueada, e acondicionados individualmente em sacos plásticos selados foram conservados a 4 °C e a -70 °C. Dot-ELISA foi realizada mensalmente, com os mesmos soros positivos e

negativos. A avaliação da estabilidade foi somente executada para a detecção de anticorpos da classe IgG.

3.3. Tratamento de soros com gama-globulina agregada

A pesquisa de anticorpos IgM nos diferentes testes foi executada após o tratamento dos soros com gama-globulina agregada (CAMARGO et alii, 1972), para eliminar a interferência de possíveis fatores reumatóides (CLARKSON & MELLOW, 1983).

A gama globulina humana (10 mg/ml em PBS) foi agregada por aquecimento (63 °C, 10 minutos), misturada aos soros diluídos (1/5) em PBS (v/v), e incubada por 1 hora a 37 °C. Após centrifugação (5.000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e submetido aos testes imunológicos para pesquisa de anticorpos IgM e IgA anti-Trypanosoma cruzi .

4. ANÁLISE DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS TESTES

Para a avaliação das características diagnósticas dos testes sorológicos, determinou-se os índices relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo e falso negativo, conforme os conceitos de GALEN & GAMBINO (1975).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da reprodutibilidade da técnica de Dot-ELISA, utilizou-se o método gráfico de controle de qualidade descrito por HOSHINO-SHIMIZU et alii (1986).

A análise de variância dos grupos de indivíduos estudados foi executada segundo a metodologia descrita por LEVIN (1987).

As médias geométricas dos títulos de anticorpos dos testes foram determinados segundo o método de WHITE (1973).

O coeficiente de correlação e a análise de regressão linear foram calculados de acordo com a metodologia descrita por LUTZ (1967).

6. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DAS FORMAS AMASTIGOTAS (As, At) E EPIMASTIGOTAS (Es, Et) POR "IMMUNOBLOTTING"

6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras e em sistema descontínuo, foi executada segundo

metodologia descrita por LAEMMLI (1970), e com adaptações feitas por STUDIER (1973), utilizando-se o gel de separação a 10% e o de empilhamento a 3%

6.2. Preparações antigênicas

Os antígenos das formas epimastigotas (Es, Et) e das formas amastigotas (As, At) do Trypanosoma cruzi, preparados conforme descrito acima, foram diluídas em tampão da amostra (10% de glicerol; 2% de SDS; 62 mM TRIS; 700 mM 2-mercaptoetanol; 5mM EDTA; 0,1% azul de bromofenol), fervidos durante 5 minutos e aplicados no gel (80 ug/cm do pente).

A corrida eletroforética foi efetuada com voltagem inicial de 60 V e aumentada para 100 V, após a penetração da amostra no gel de separação.

6.3. "Immunoblotting"

As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 μ - BA-85, Schleicher & Schuell), segundo o método descrito por TOWBIN et alii (1979) e BURNETTE (1981).

A transferência foi efetuada em voltagem constante de 50 V, durante 24 horas a 4 °C. Após a transferência, o gel foi corado com Coomassie blue (0,2%) e a membrana com Ponceau S (0,5% em 0,1% ácido acético), a fim de verificar a

eficiência da transferência. A membrana de nitrocelulose foi descorada em água bidestilada, acondicionada em plástico e cortada em tiras de 4 mm para o ensaio imunoenzimático.

Os marcadores dos pesos moleculares transferidos para a membrana de nitrocelulose foram corados com negro de amido (0,02% em ácido acético).

A reação imunoenzimática feita com soros de pacientes chagásicos de fase aguda e crônica foi realizada "in situ", segundo ANDERTON & THORPE (1980).

Os padrões de peso molecular usados foram: fosforilase b (94 kDa); albumina bovina (67 kDa); ovoalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa) e alfa-lactoalbumina (14,4 kDa) (Pharmacia)

Os pesos moleculares (P.M.) das bandas reativas foram determinados a partir da relação linear entre o log do P.M. e migração relativa (Rf) de proteínas padrões.

RESULTADOS

1. REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA COM A FORMA AMASTIGOTA DO TRYPANOSOMA CRUZI (IFI-A) PARA A DETECÇÃO DOS ANTICORPOS IgG, IgM e IgA ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI.

As formas amastigotas do Trypanosoma cruzi foram utilizadas como antígeno na reação de IFI (ítem 3.1.4. de Materiais e Métodos) para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA.

A titulação em bloco dos conjugados fluorescentes anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA humanos forneceram a diluição ótima respectivamente nas diluições de 1:900, 1:100 e 1:100.

Foi tomada como reação de referência, a de IFI com formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi (IFI-E) onde os conjugados anti-IgG, IgM e IgA tiveram o título ótimo de uso de 100.

A reação de IFI-A destacou-se pela fácil leitura da reação acarretada pela intensa fluorescência e nitidez em toda a periferia da membrana das formas amastigotas quando comparada com as formas epimastigotas na IFI-E. A reação foi considerada negativa pela ausência de fluorescência, onde os parasitas geralmente se apresentavam avermelhados.

2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DOT-ELISA PARA A DETECÇÃO DOS ANTICORPOS IgG, IgM e IgA ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI.

A padronização da técnica de Dot-ELISA, na detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA, foi efetuada utilizando-se 5 tipos de extratos antigênicos das formas amastigotas obtidas segundo o item 3.2.2. de Materiais e Métodos. Os melhores resultados foram conseguidos com o parasita solubilizado em meio alcalino (As) e aquele fragmentado por ultrasonicação (At).

Os antígenos quando lisados com detergentes aniônicos (SDS) ou detergentes não iônicos (NP-40) apresentaram títulos compatíveis com aqueles obtidos com o antígeno As, porém difundiram-se radialmente, quando aplicados sobre a membrana de nitrocelulose, demonstrando pontos centrais totalmente claros após revelação da reação.

O antígeno lisado com o detergente aniônico DOC apresentou reatividade homogênea, todavia os resultados em títulos foram inferiores àqueles observados com o antígeno As.

Em vista destes resultados, as formas amastigotas do Trypanosoma cruzi lisadas com detergentes aniônicos (SDS, DOC) e não iônicos (NP-40) foram excluídos por não se prestarem ao nosso objetivo e assim, os antígenos As e At foram melhor estudados, na técnica de Dot-ELISA denominadas de Dot-As e Dot-At, respectivamente.

A titulação em bloco dos conjugados enzimáticos anti-IgG (Figura 1), anti-IgM e anti-IgA humanos forneceu títulos 500, 100 e 100, respectivamente.

A concentração ótima de antígeno empregada foi de 2 µg/µl de proteínas, tanto para o antígeno As como para At e Es.

A reação de Dot-ELISA positiva caracterizada pelo desenvolvimento de cor violácea foi facilmente discernida da reação negativa que apresentava ausência completa de coloração, sem nenhuma reação de fundo.

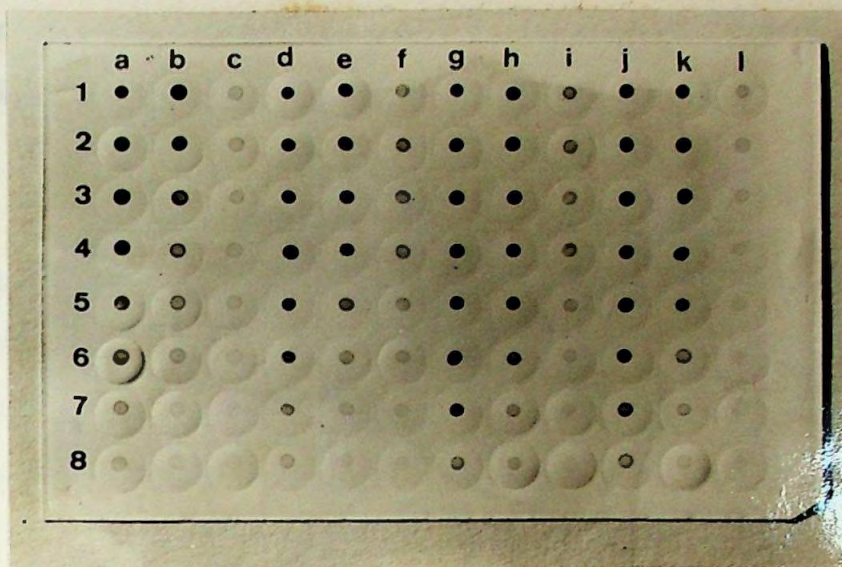
Figura 1 - Titulação do conjugado e determinação da concentração do antígeno As para detecção de anticorpos da classe IgG na técnica de Dot-ELISA.

A - conjugado diluído 1:250
B - conjugado diluído 1:500
C - conjugado diluído 1:1000

1a, 1d, 1g, 1j - soro chagásico crônico diluído a partir de 1:80
(positivo com título de 10.240)
1b, 1e, 1h, 1k - soro chagásico crônico diluído a partir de 1:80
(positivo com título de 5.120)
1c, 1f, 1i, 1l - soro normal diluído a partir de 1:5
(negativo com título de 40)

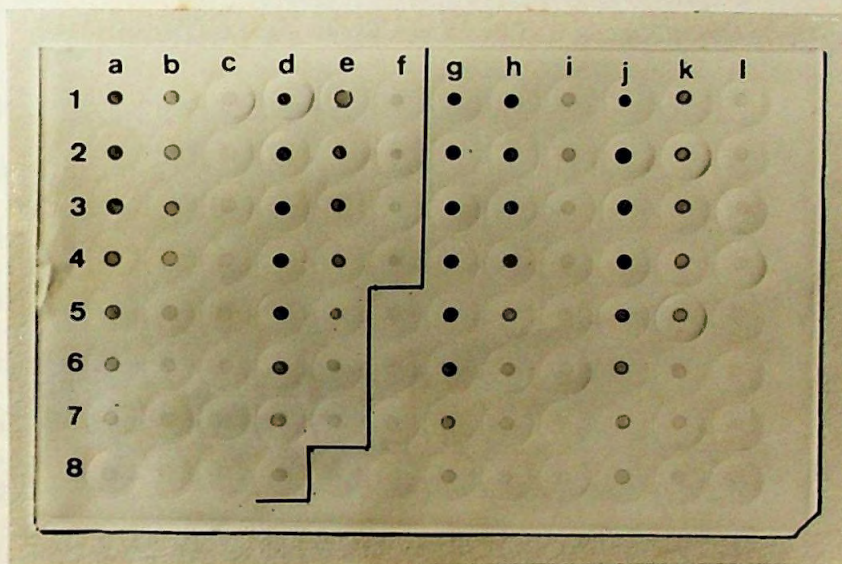
1 a 8 - diluições seriadas dos soros

a, b, c - antígeno na concentração de 4 ug/ul
d, e, f - antígeno na concentração de 2 ug/ul
g, h, i - antígeno na concentração de 1 ug/ul
j, k, l - antígeno na concentração de 0,5 ug/ul

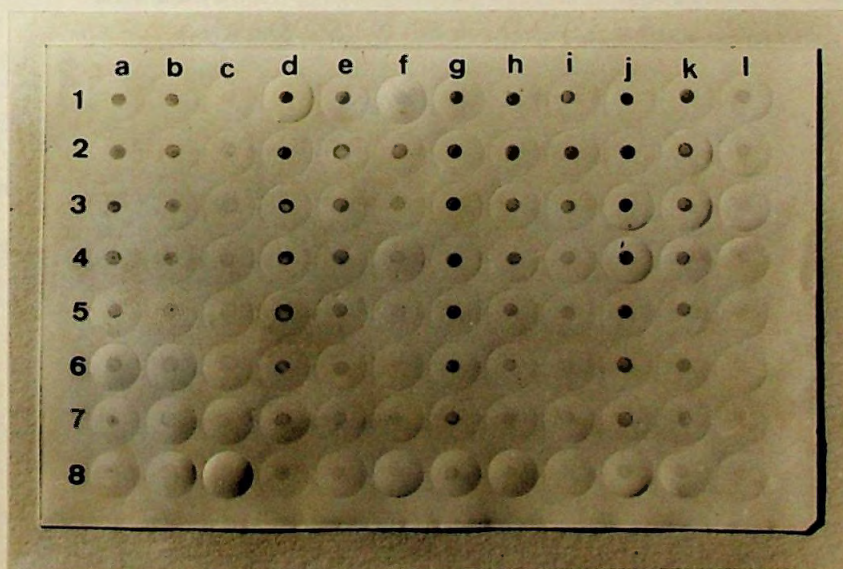


A

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Físicas
Universidade de São Paulo



B



C

3. DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE (LR) E DOS ÍNDICES AVALIADORES DOS TESTES.

Os resultados obtidos na determinação dos limiares de reatividade das técnicas de Imunofluorescência Indireta e Dot-ELISA para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA estão apresentados nas Figuras 2, 6, 10 e 14. Para se obter a máxima discriminação entre os grupos de indivíduos chagásicos e não chagásicos, os índices relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, bem como os valores preditivos positivo e negativo, além de falsos positivo e negativo foram determinados para cada limiar de reatividade correspondente às diluições do soro, a partir de 1:5. As Figuras 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 e 13 mostram os índices acima referidos obtidos para diferentes limiares de reatividade, expressos em títulos, de acordo com o tipo da reação sorológica.

O critério adotado para a determinação do limiar de reatividade foi aquele cujo título fornecia, de preferência, maiores índices de sensibilidade, especificidade e eficiência, com mínimo de resultados falsos positivos (100 - valor preditivo positivo) e falsos negativos (100 - valor preditivo negativo). Desta forma, para a detecção de anticorpos da classe IgG, os limiares de reatividade escolhidos foram: título 20 para IFI-E; 80 para IFI-A e títulos de 160 para Dot-As e Dot-At (Figuras 2, 3 e 4).

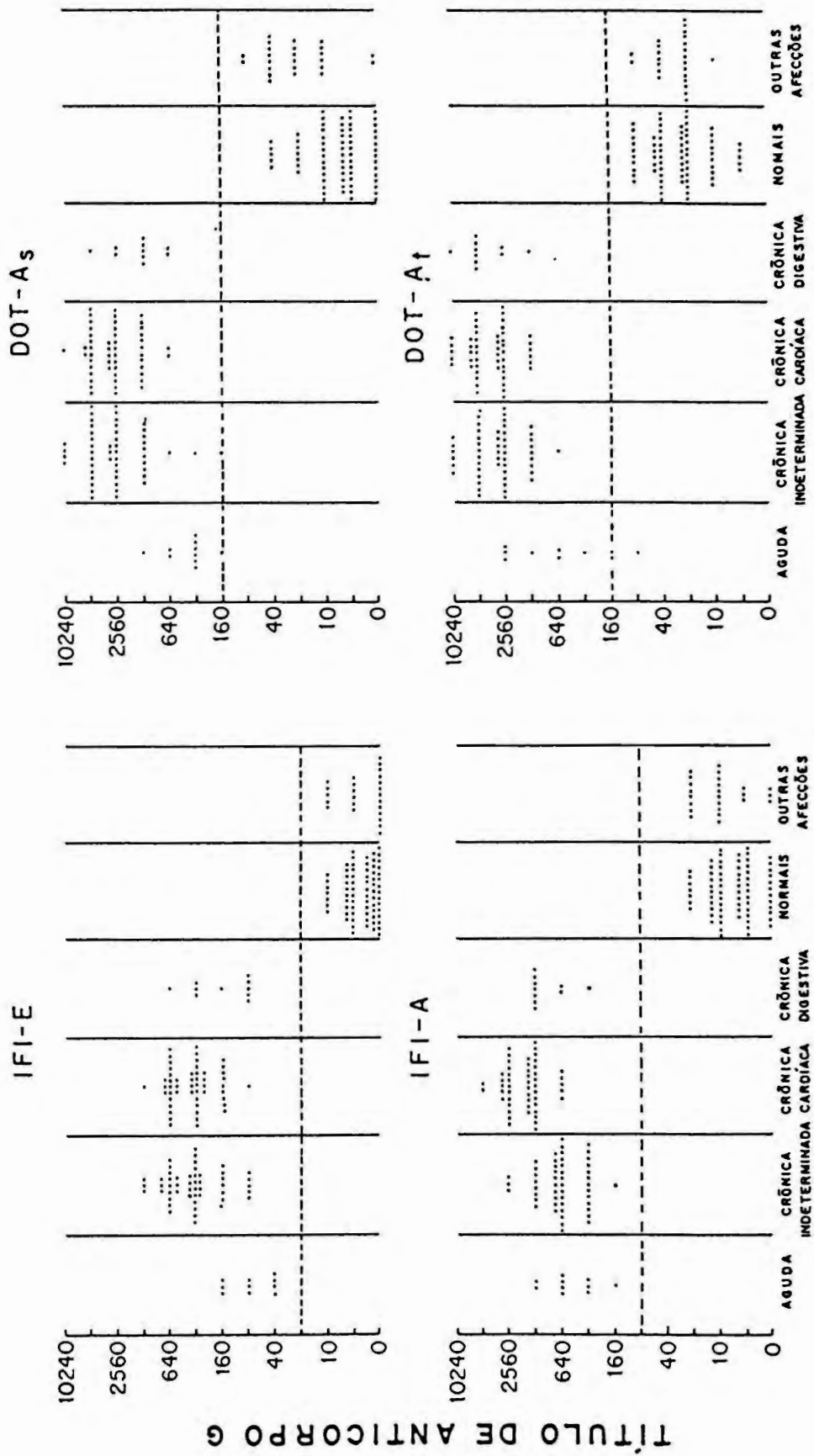


Figura 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Figura 3 - Desempenho diagnóstico das reações de IFI-E e IFI-A em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, no estudo de 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

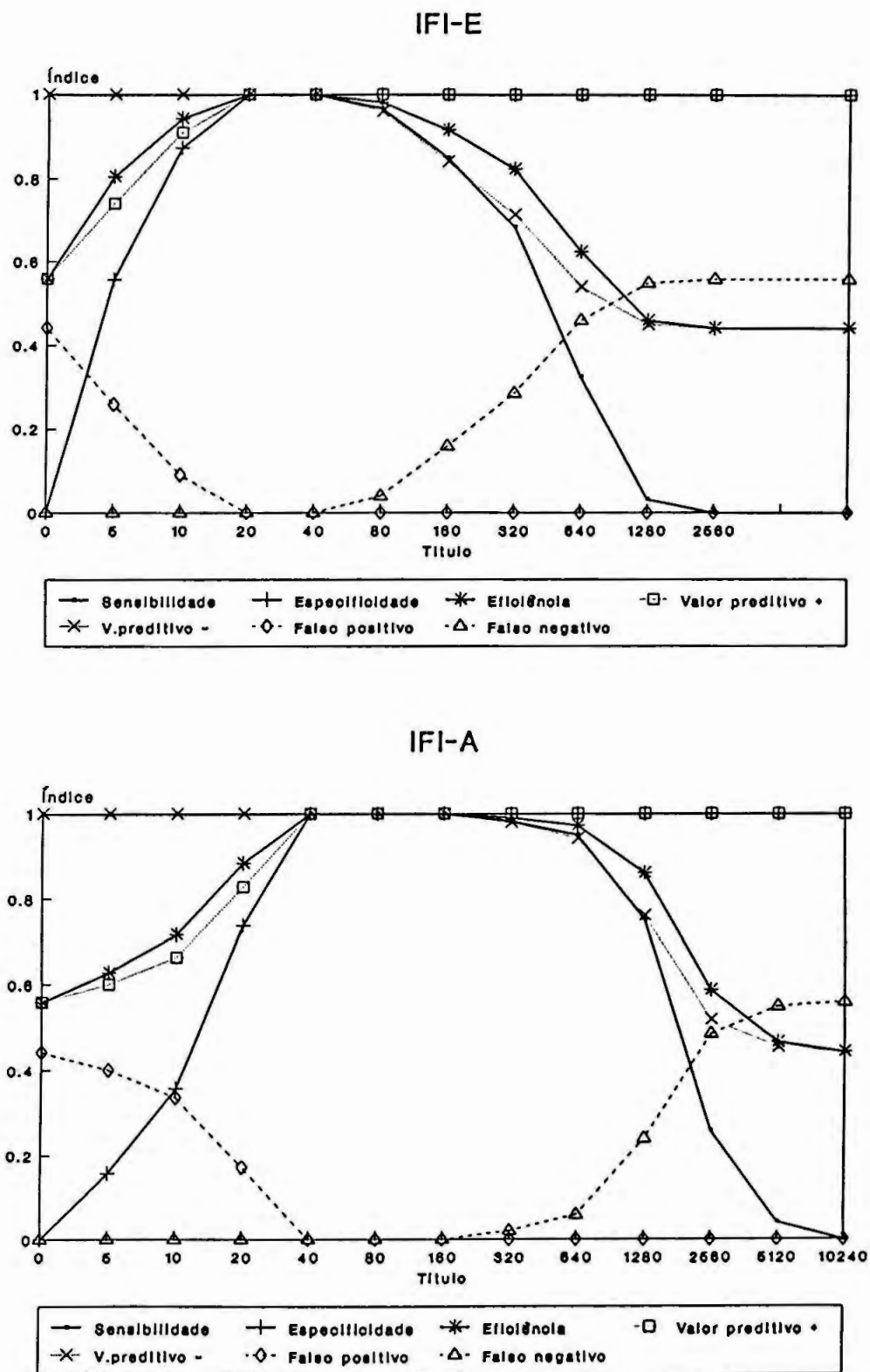


Figura 4 - Desempenho diagnóstico das técnicas de Dot-As e Dot-At em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, no estudo de 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

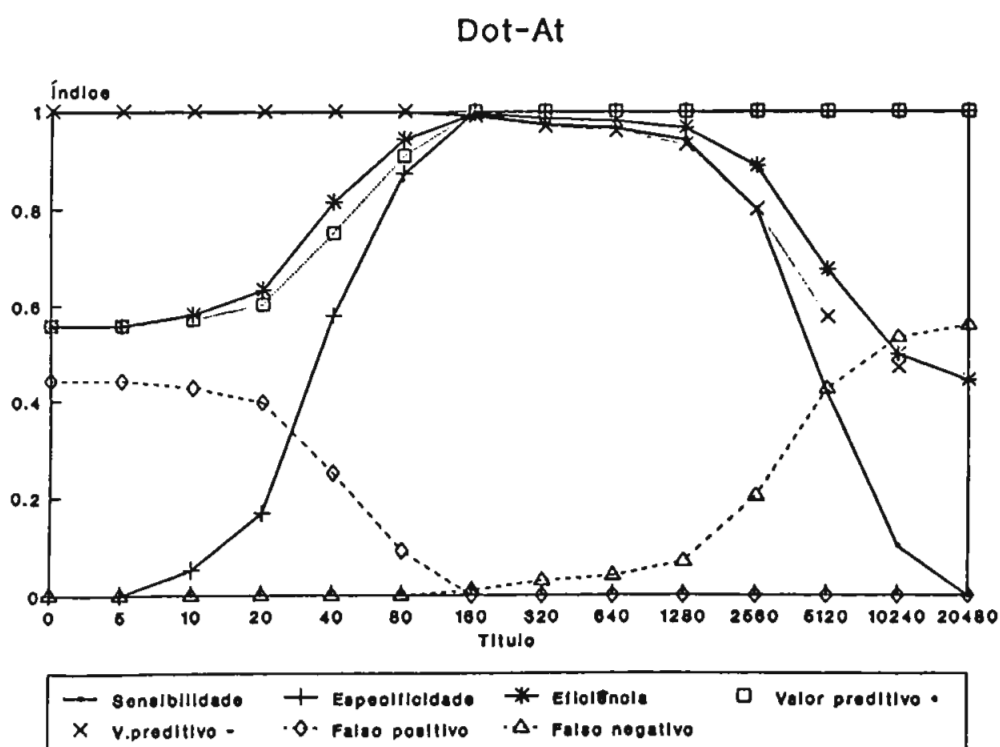
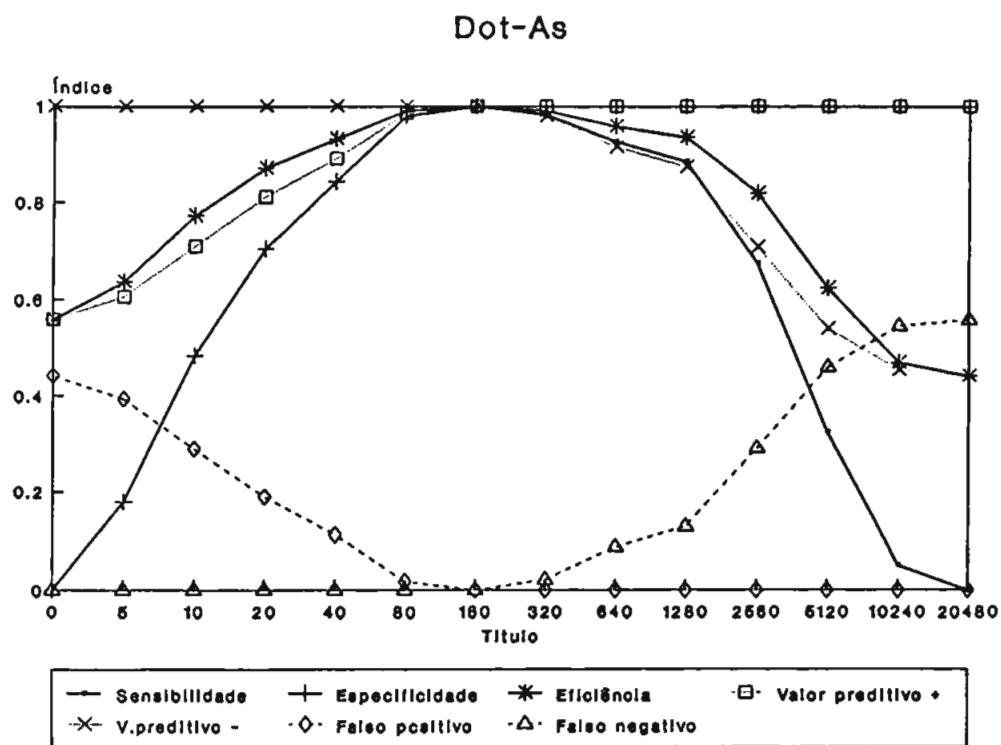
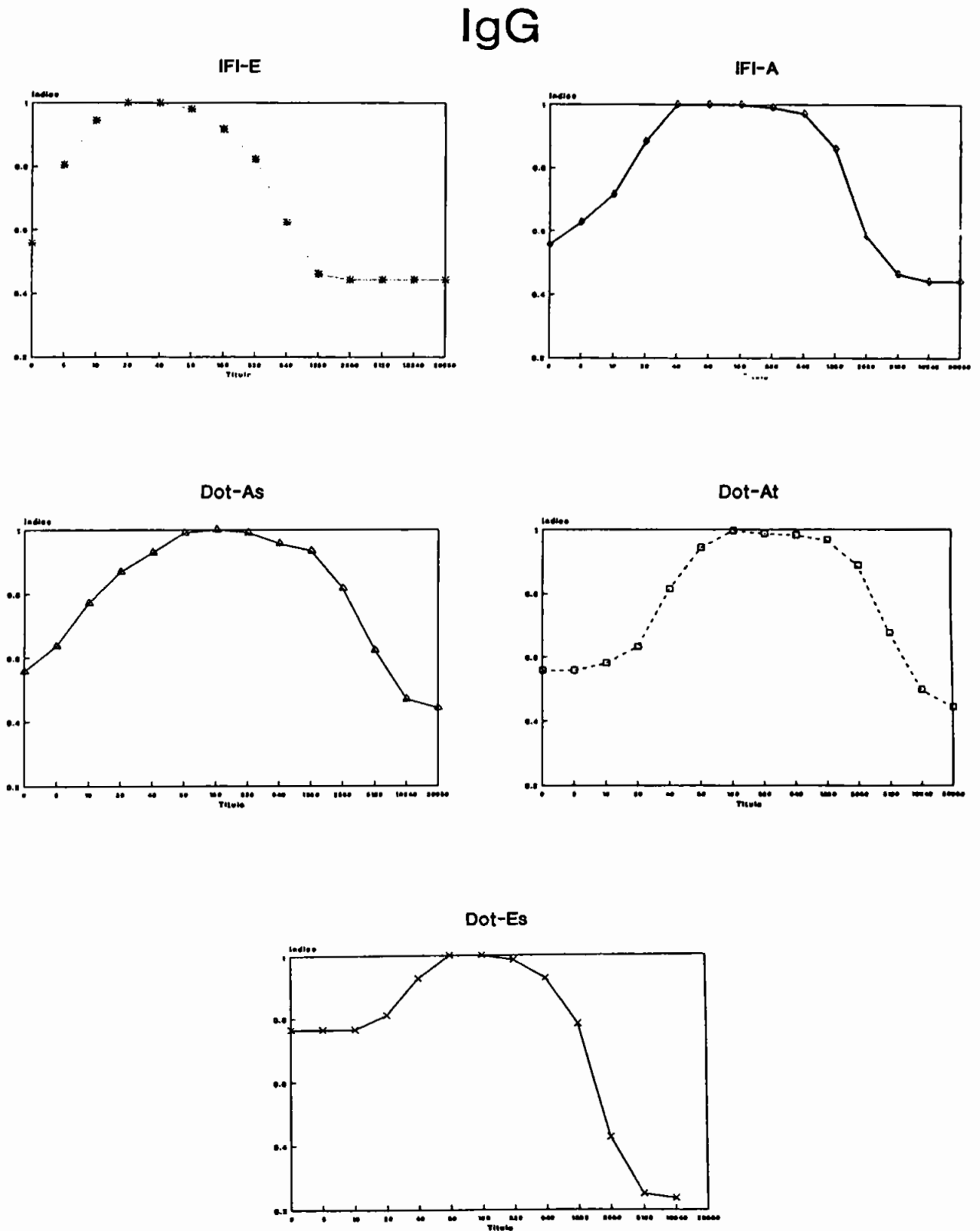


Figura 5 - Curva de eficiência relativa das técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As, Dot-Es e Dot-At para detecção de anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.



A pesquisa de anticorpos IgM foi realizada em todas as amostras estudadas, mas em virtude da predominância destes anticorpos em pacientes com infecção chagásica aguda, a avaliação foi efetuada somente nos pacientes com a forma aguda da doença.

Para a detecção de anticorpos da classe IgM, os limiares de reatividade foram: título 40 para IFI-E; 160 para IFI-A; 40 para Dot-As e 80 para Dot-At (Figuras 6, 7 e 8).

Para a detecção de anticorpos IgA, os limiares de reatividade foram escolhidos nas regiões de máxima eficiência, quais sejam: títulos 5 para IFI-E; 20 para IFI-A; 5 para DOT-As e DOT-At (Figuras 10, 11 e 12).

Os dados que compõem estas figuras podem também ser vistos nas Tabelas e Quadros 1, 2 e 3. do anexo.

Em relação aos índices apresentados para anticorpos IgA, verifica-se que apesar de uma especificidade satisfatória, a eficiência foi baixa e com valores muito próximos em todos os testes.

A análise de variância em relação aos anticorpos da classe IgA não demonstrou nenhuma relêvancia significativa entre os pacientes chagásicos, portanto, a análise da eficiência destes anticorpos constitui somente objetivo complementar deste estudo, motivo pelo qual seus resultados não devem ser considerados para fins de diagnóstico.

Reações sorológicas que apresentam a curva da eficiência com maior número de pontos próximos a 1 constituem as melhores, e permite obter resultados mais reprodutíveis e com maior capacidade discriminativa do que aquelas que têm apenas um ponto, ou índice, no seu pico máximo (Figuras 5, 9 e 13).

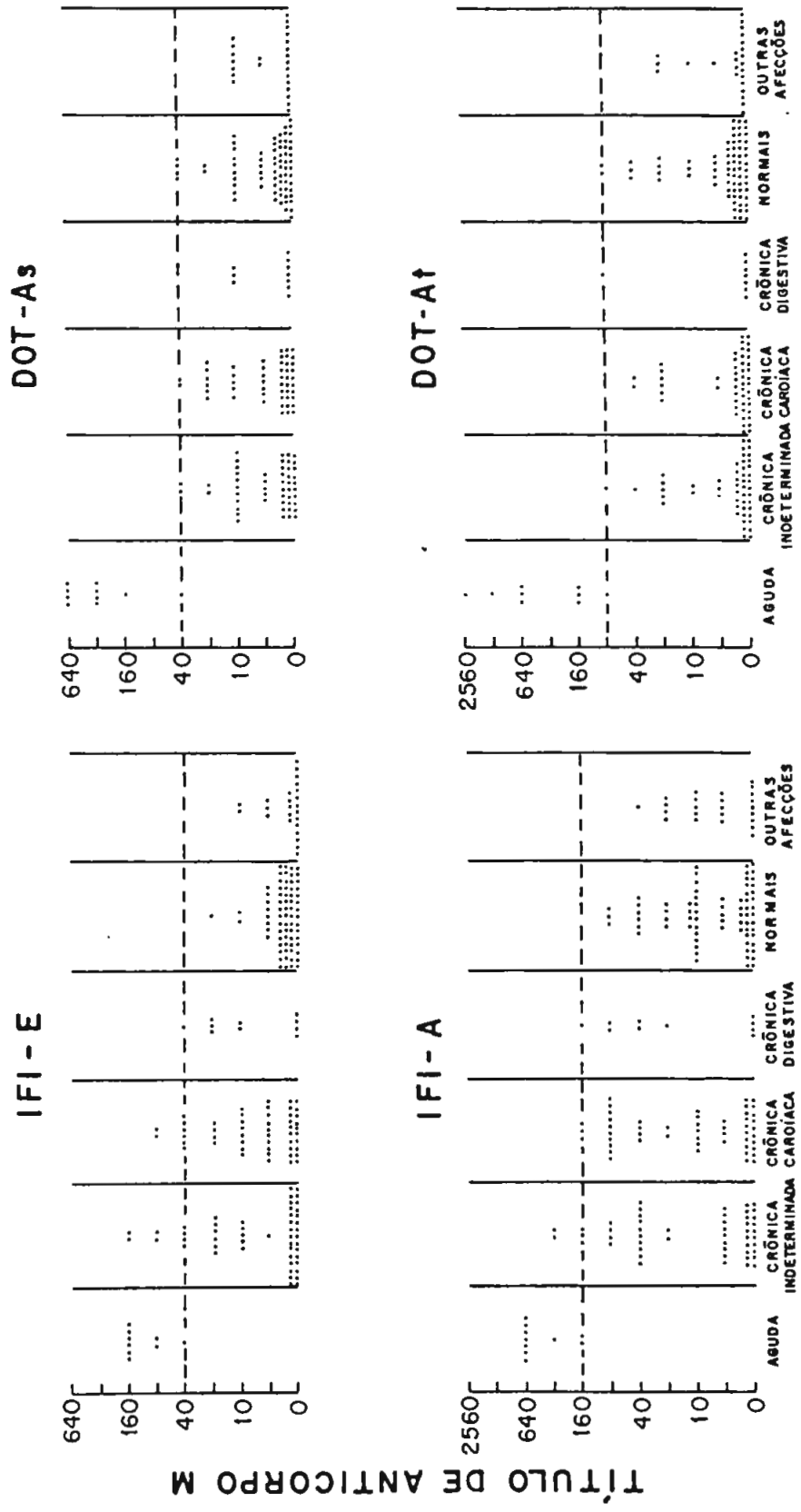


Figura 6 - Distribuição dos títulos de anticorpos IgM, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de pacientes com infecção chagásica aguda e de indivíduos não chagásicos, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA

Figura 7 - Desempenho diagnóstico das reações de IFI-E e IFI-A em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgM, anti-*Trypanosoma cruzi*, em 105 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

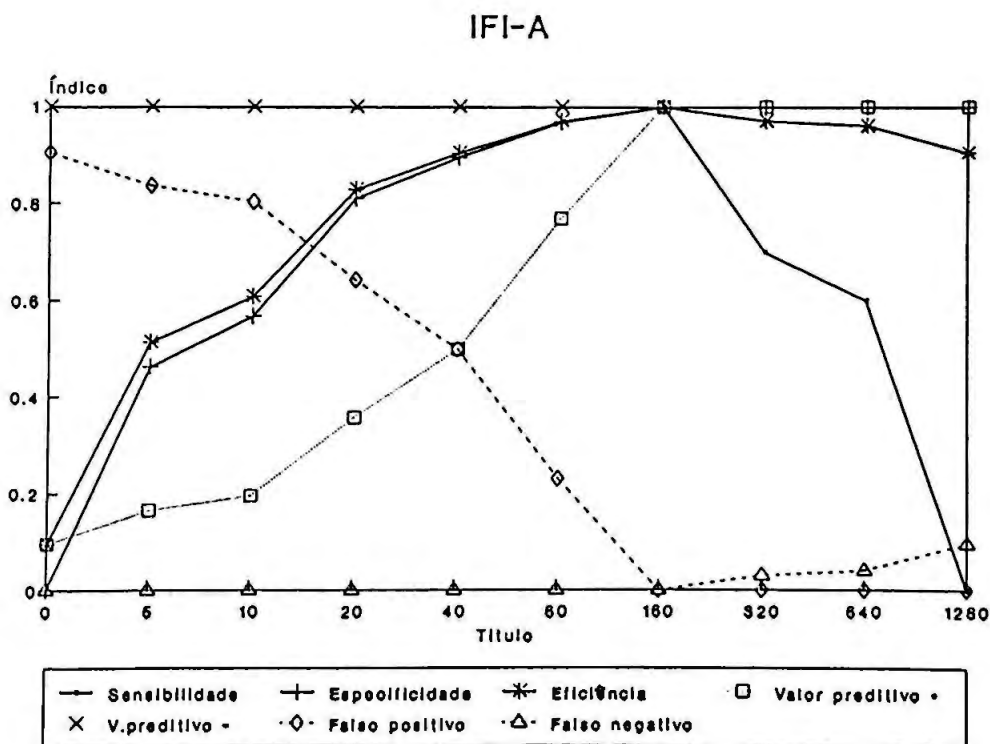
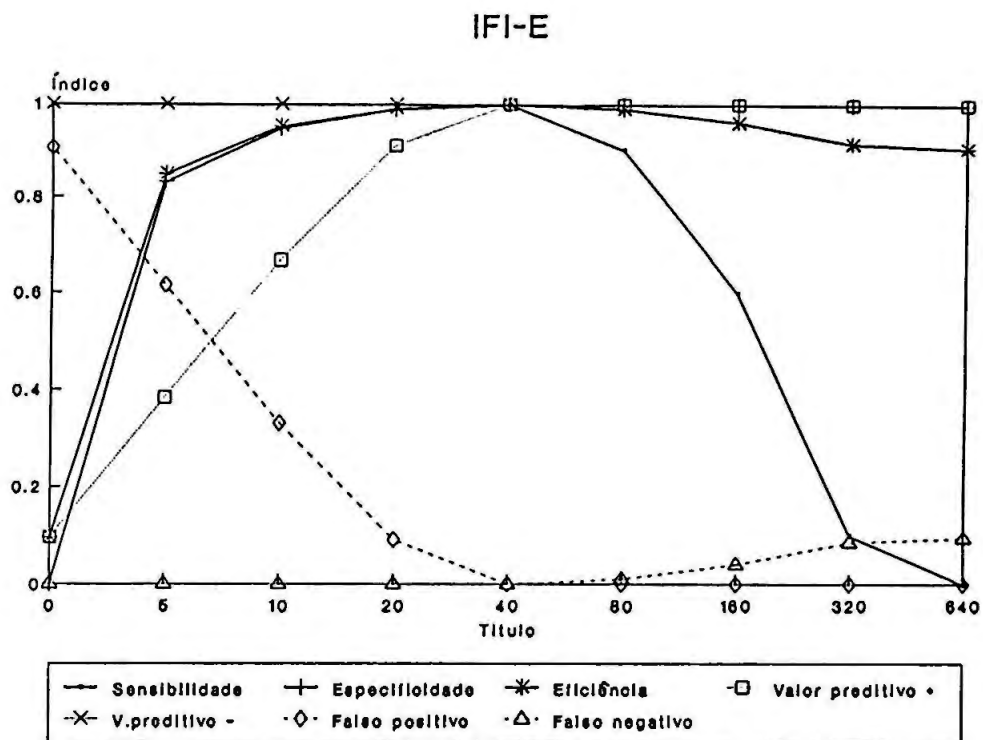


Figura 8 - Desempenho diagnóstico das técnicas de Dot-As e Dot-At em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgM, anti-*Trypanosoma cruzi*, em 105 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

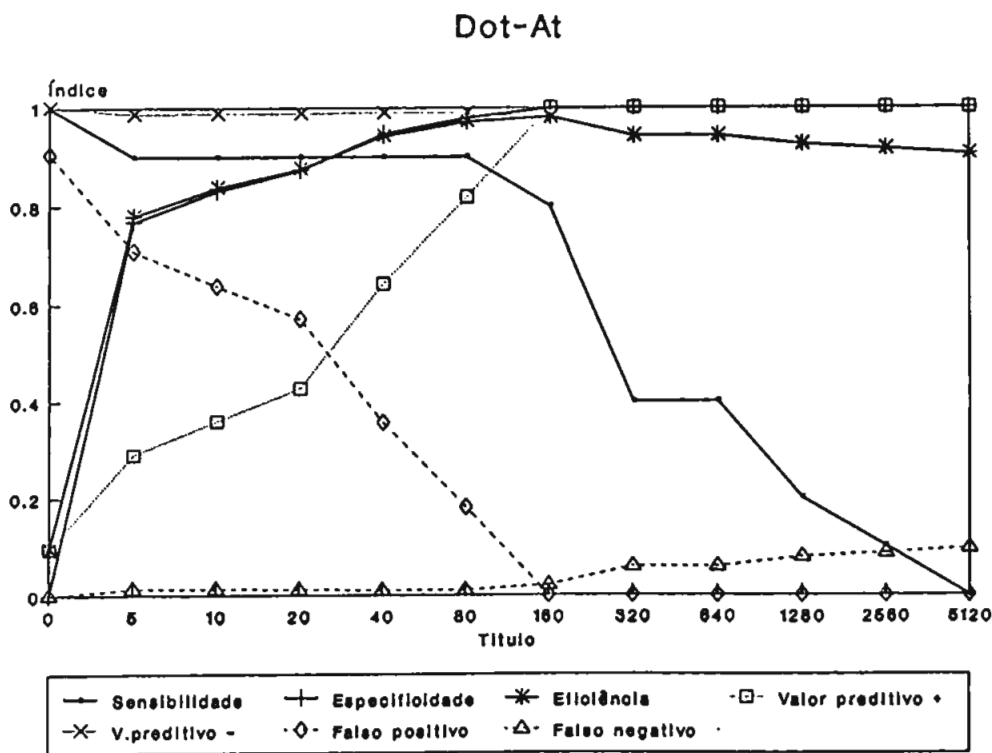
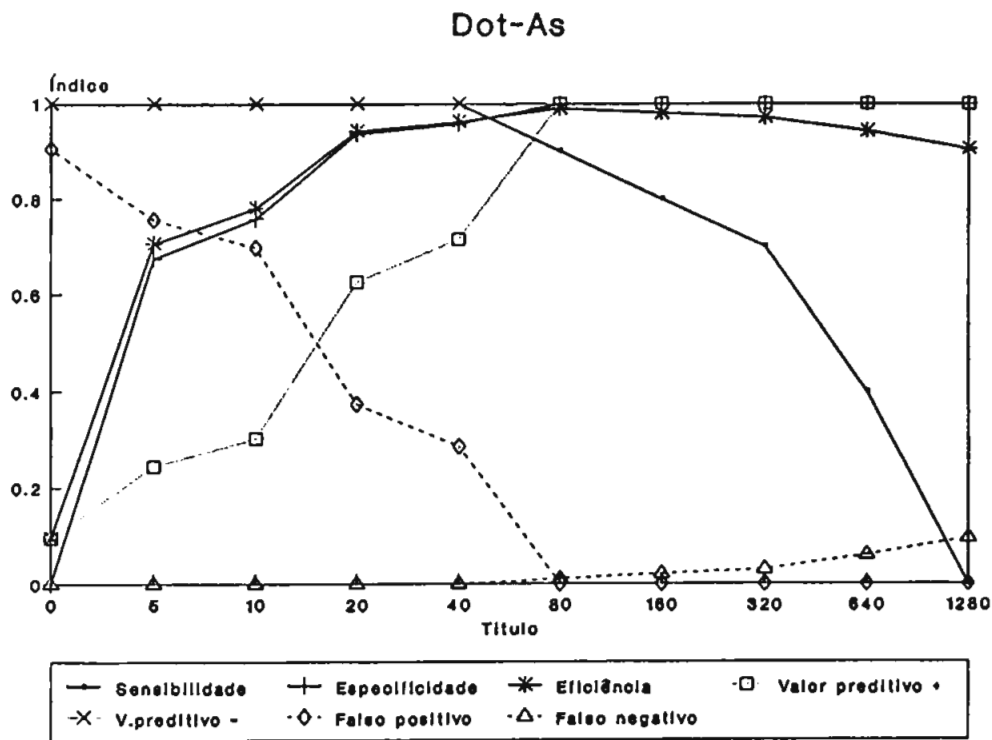
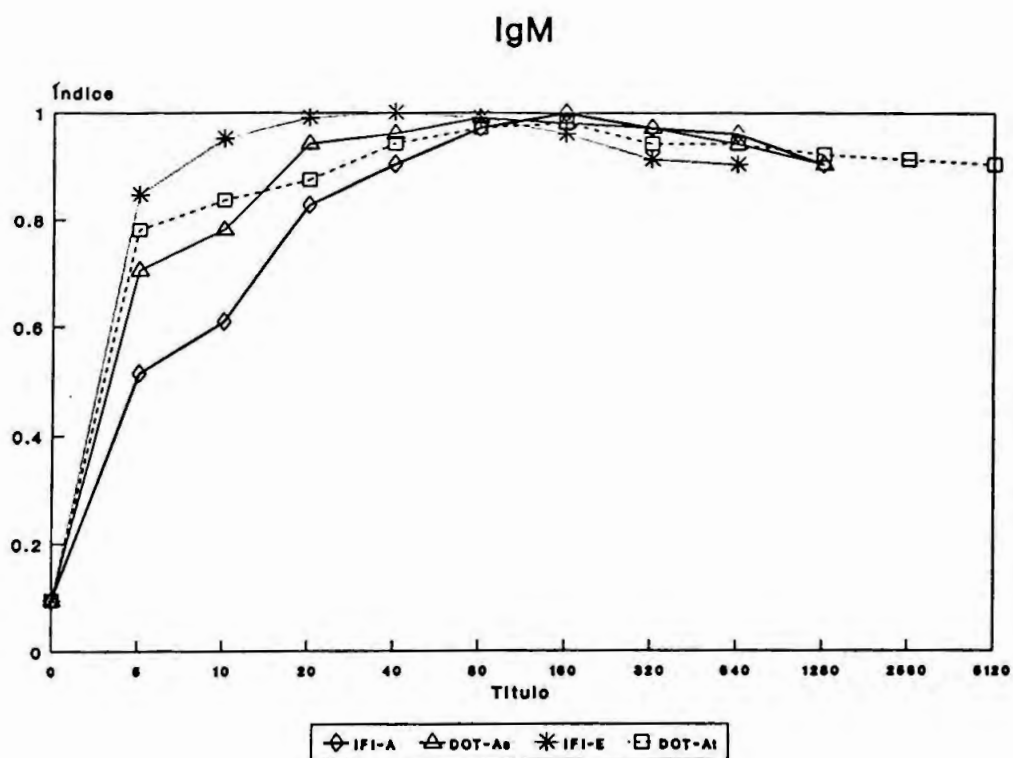


Figura 9 - Curva de eficiência relativa das técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At, para detecção de anticorpos IgM, anti-Trypanosoma cruzi, em 105 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo



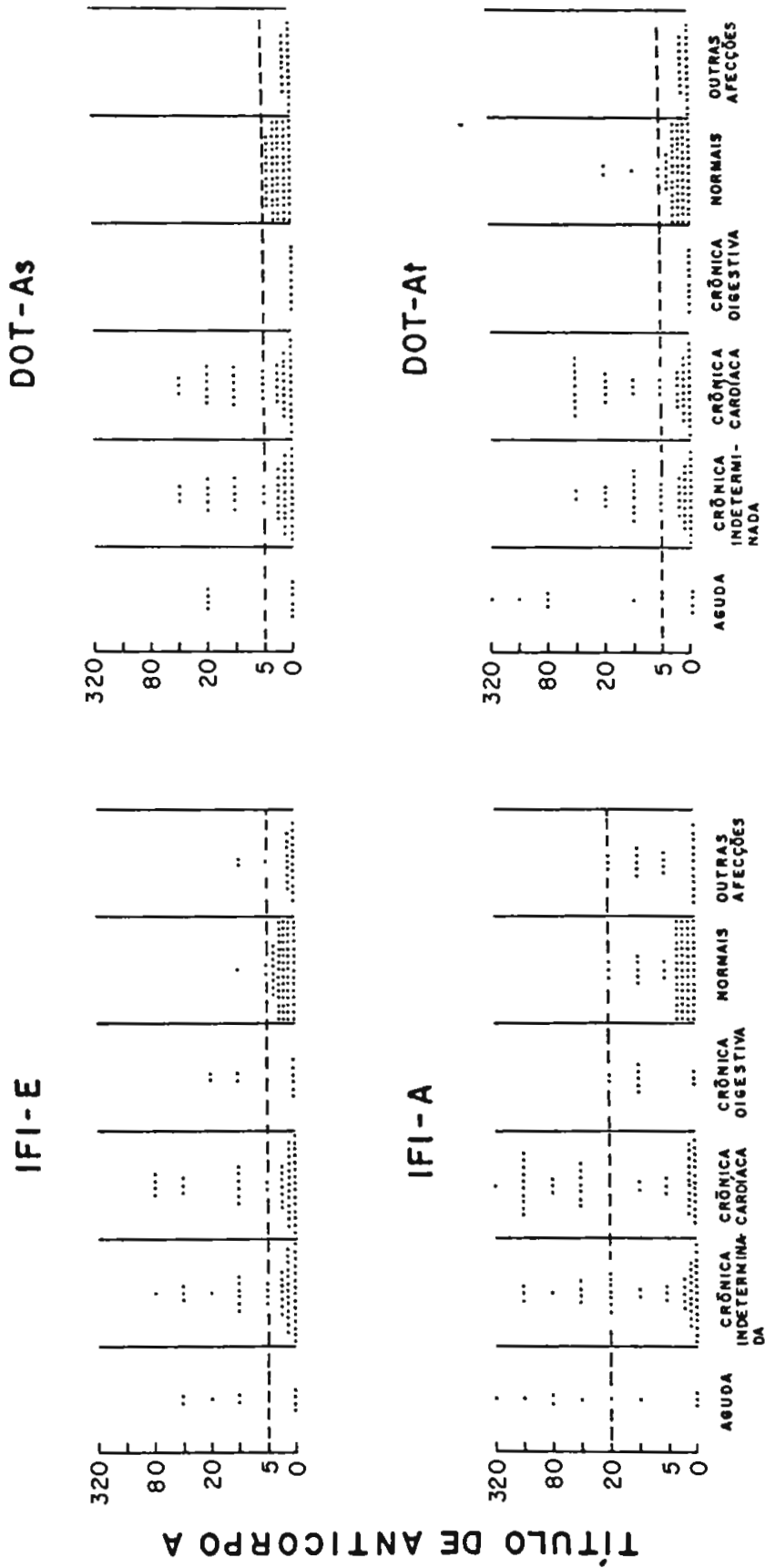


Figura 10 - Distribuição dos títulos de anticorpos IgA, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Figura 11 - Desempenho diagnóstico das reações de IFI-E e IFI-A em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgA, anti-*Trypanosoma cruzi*, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

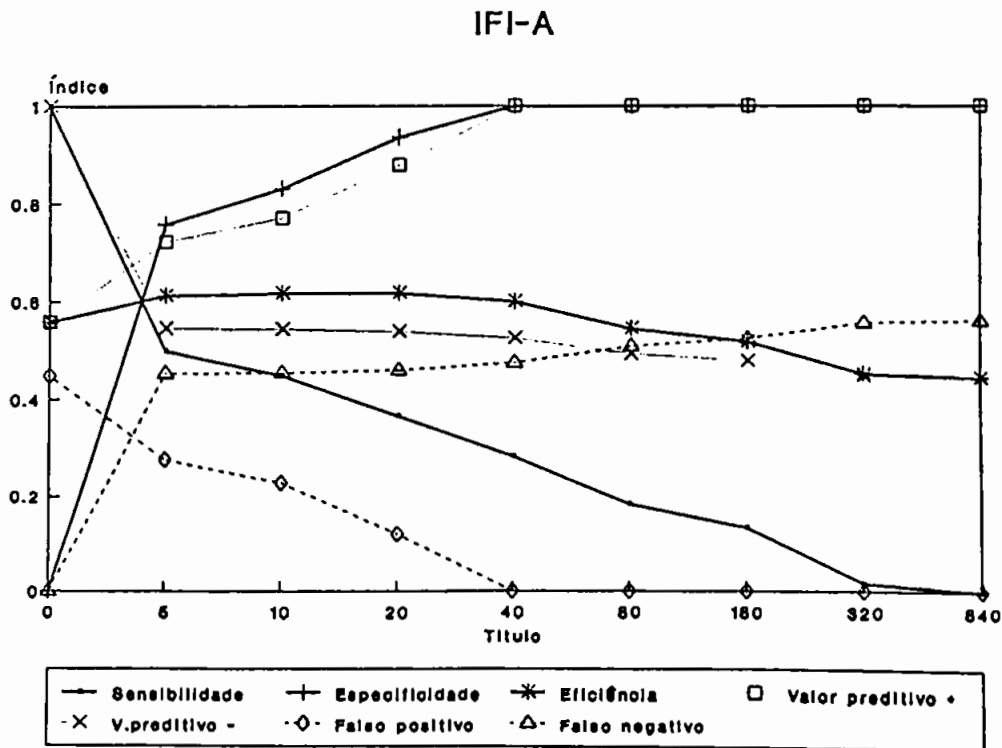
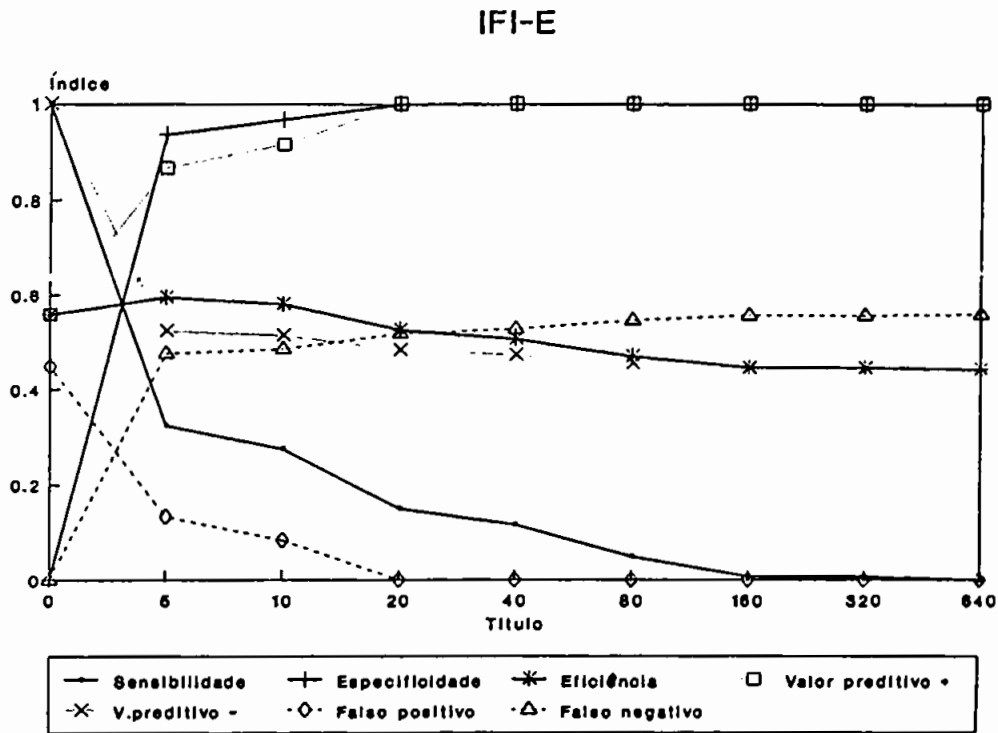


Figura 12 - Desempenho diagnóstico das técnicas de Dot-As e Dot-At em termos de sensibilidade, especificidade e eficiência relativa, frente aos títulos de anticorpos IgA, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

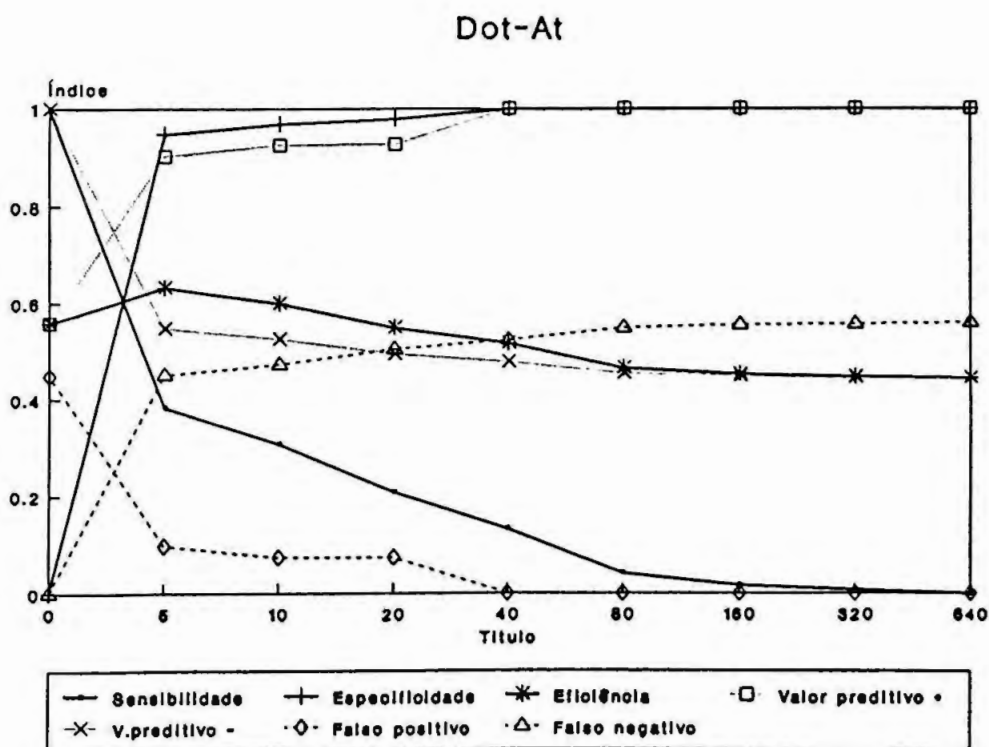
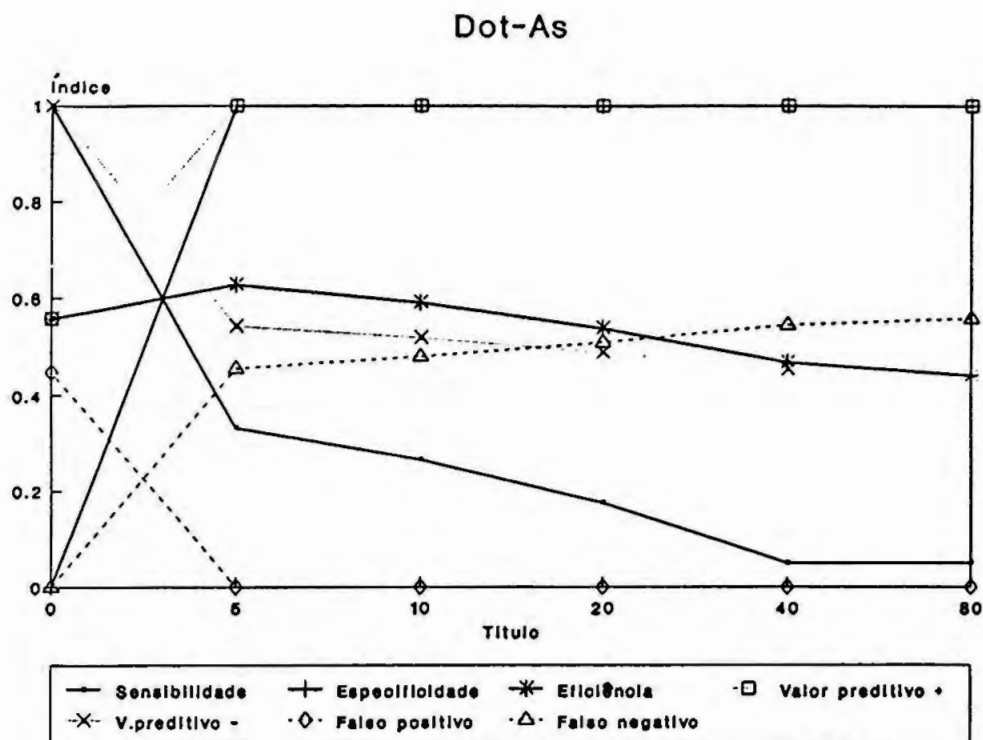
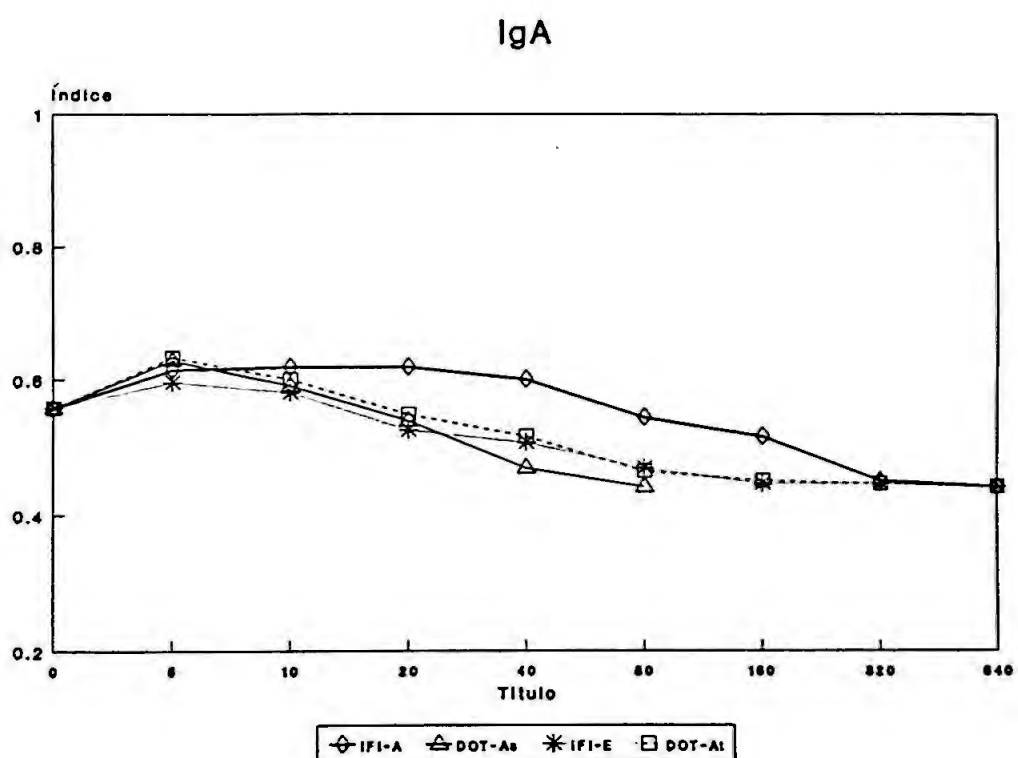


Figura 13 - Curva de eficiência relativa das técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At, para detecção de anticorpos IgA, anti-Trypanosoma cruzi, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.



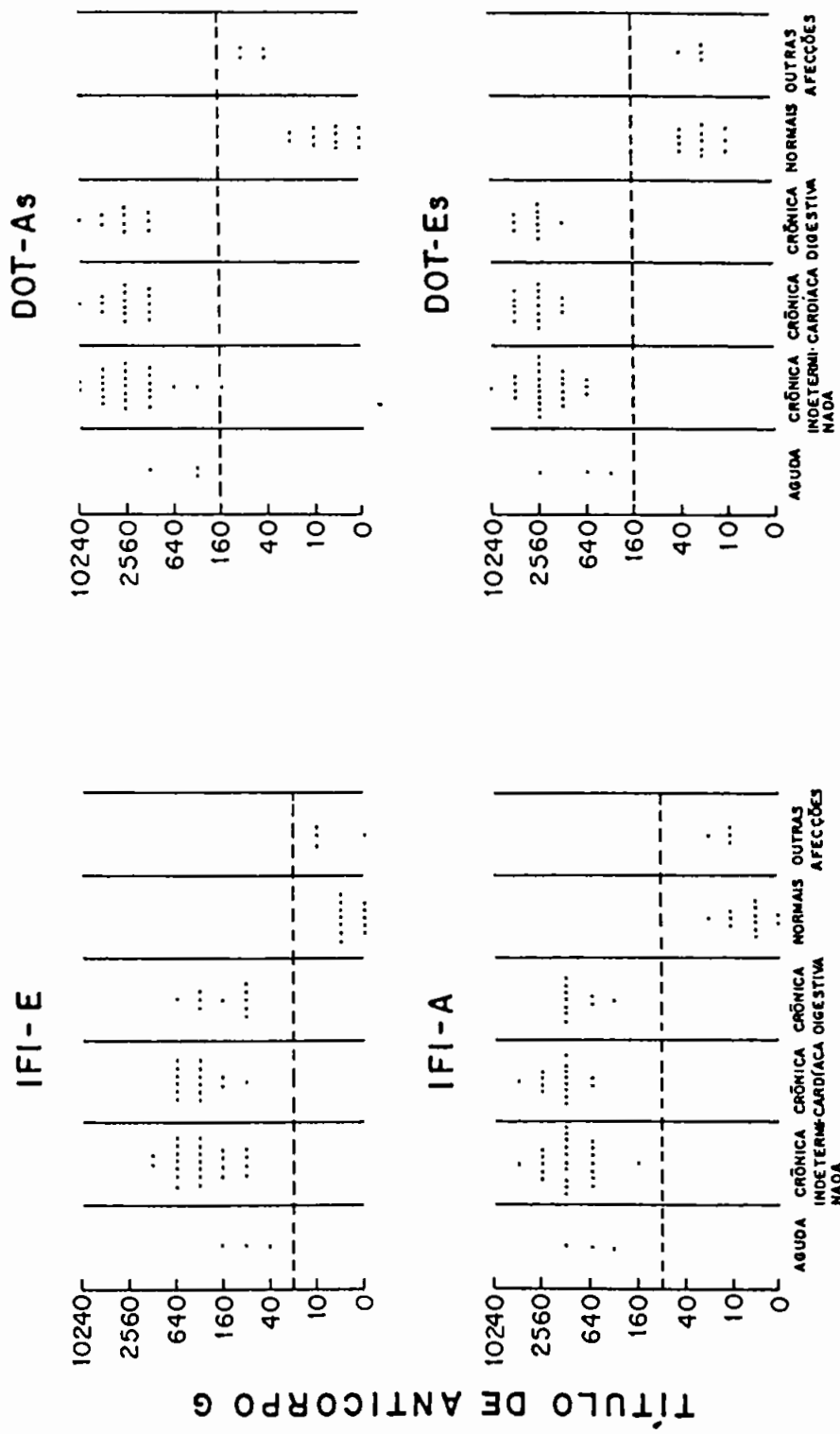


Figura 14 - Distribuição dos títulos de anticorpos Igg, anti-Trypanosoma cruzi, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA. Comparação entre 68 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos.

4. ÍNDICES AVALIADORES DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DAS TÉCNICAS DE IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG, IgM e IgA.

Após o estabelecimento dos limiares de reatividade, os índices relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência relativa, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo, falso negativo encontrados nas técnicas de IFI e Dot-ELISA, para a detecção das diferentes classes de anticorpos foram calculados, e estão ilustrados na Figura 15.

O gráfico resume globalmente os resultados, tornando possível uma análise dos índices ao nível dos limiares de reatividade estabelecidos, e mostrando que na detecção de anticorpos IgG todos os testes apresentam semelhantes características diagnósticas.

Para detecção de anticorpos IgM foram observados índices relativos máximos para as reações de IFI (E e A).

A análise de anticorpos da classe IgA mostra que ela foi pouco detectada nos testes, constatada pelos baixos índices encontrados.

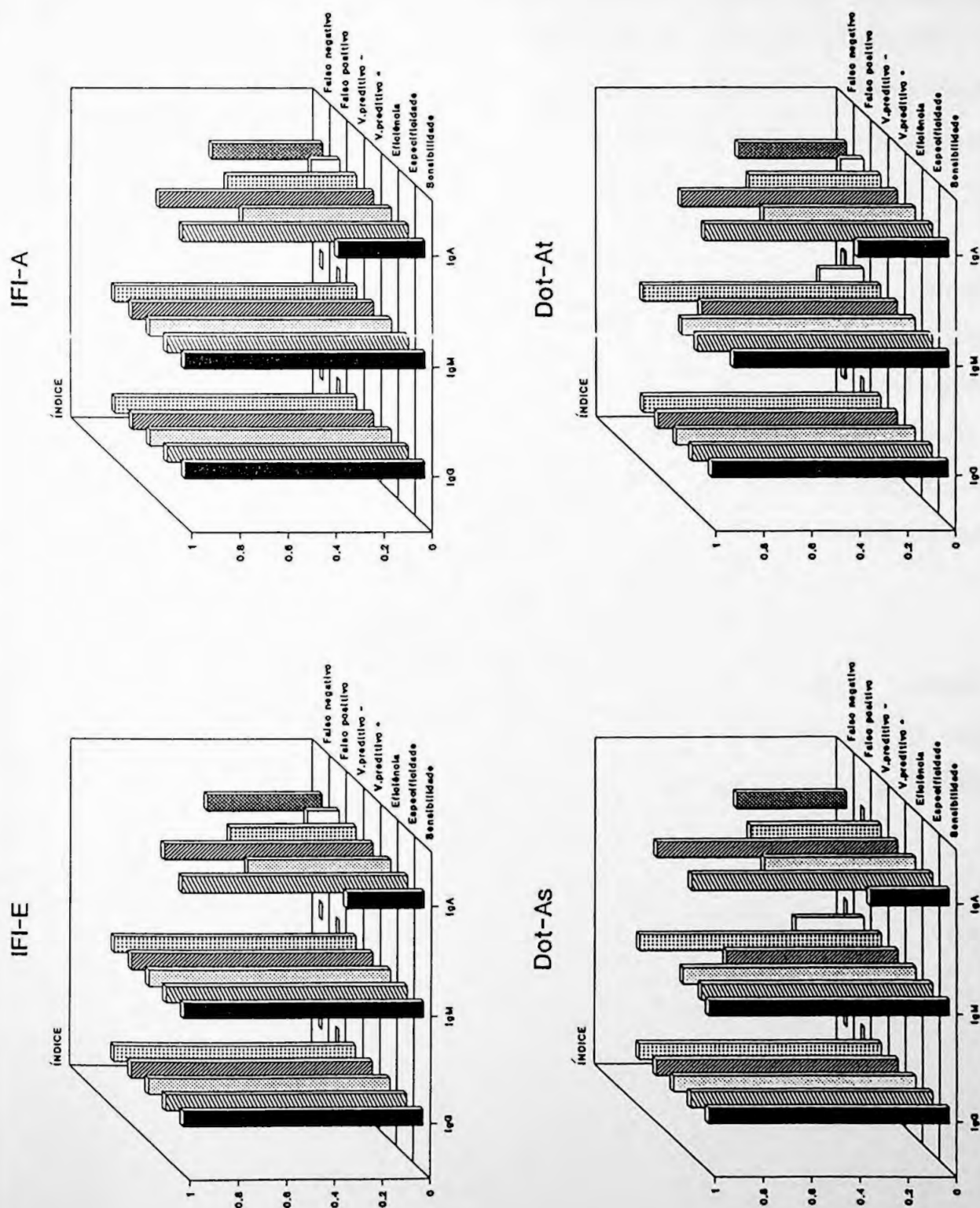


Figura 15 - Índices relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo e falso negativo, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA, para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA, anti-Trypanosoma cruzi.

5. POSITIVIDADE EM TÉCNICAS QUALITATIVAS DE IFI (E e A) e DOT-ELISA (As, At) PARA ANTICORPOS IgG, IgM e IgA

A positividade encontrada para anticorpos IgG, IgM e IgA nas diferentes técnicas para os diferentes grupos de indivíduos (Tabela I) foram expressos em números absolutos e percentuais, após o estabelecimento do limiar de reatividade para cada teste, isto é, foram considerados positivos, os soros com reatividade igual ou acima do limiar de reatividade.

Os anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, foram encontrados em todos os soros de pacientes chagásicos agudos e crônicos, com exceção de um paciente com infecção chagásica aguda, que não apresentou reatividade em DOT-At. Verificou-se, como esperado, uma alta positividade de anticorpos IgG nos soros de pacientes com leishmaniose visceral, com títulos de até 1280.

A presença dos anticorpos IgM, anti-Trypanosoma cruzi, foi observada em todos os pacientes com infecção chagásica aguda, em poucos pacientes com infecção crônica, e raramente em indivíduos normais

Tabela II - Positividade das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Trypanosoma cruzi*, observada em 223 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Formas Clínicas	Testes Utilizados											
	IFI-E*			IFI-A*			DOT-As*			DOT-At*		
	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
Doença de Chagas:												
Aguda(%)	100 (10/10)	100 (10/10)	50 (05/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	60 (06/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	40 (04/10)	90 (09/10)	90 (09/10)	60 (06/10)
Crônica												
Indeterminada(%)	100 (50/50)	16 (08/50)	30 (15/50)	100 (50/50)	10 (05/50)	30 (15/50)	100 (50/50)	04 (02/50)	32 (16/50)	100 (50/50)	02 (01/50)	40 (20/50)
Crônica Cardíaca(%)	100 (50/50)	16 (08/50)	30 (15/50)	100 (50/50)	06 (03/50)	42 (21/50)	100 (50/50)	04 (02/50)	40 (20/50)	100 (50/50)	00 (00/50)	40 (20/50)
Crônica Digestiva(%)	100 (10/10)	40 (04/10)	40 (04/10)	100 (10/10)	10 (01/10)	20 (02/10)	100 (10/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	100 (10/10)	10 (01/10)	00 (00/10)
Normais(%)	00 (00/71)	00 (00/71)	4,2 (03/71)	00 (00/71)	00 (00/71)	4,2 (03/71)	00 (00/71)	5,6 (04/71)	00 (00/71)	00 (00/71)	2,8 (02/71)	7,0 (05/71)
Outras Infecções:												
Leishmaniose												
Visceral(%)	62,5 (05/08)	00 (00/08)	00 (00/08)	62,5 (05/08)	00 (00/08)	25 (02/08)	62,5 (05/08)	12,5 (01/08)	12,5 (01/08)	75 (06/08)	12,5 (01/08)	12,5 (01/08)
Febre Reumática(%)	25 (01/04)	00 (00/04)	25 (01/04)	00 (00/04)	00 (00/04)	25 (01/04)	00 (00/04)	00 (00/04)	00 (00/04)	00 (00/04)	00 (00/04)	00 (00/04)
Sífilis(%)	00 (00/10)	00 (00/10)	10 (01/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	20 (02/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	00 (00/10)	00 (00/10)
L.E.S.(%)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)
Malária(%)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)	00 (00/05)

*E epimastigota

A amastigota

As antígeno solúvel de amastigota

At antígeno total de amastigota

Anticorpos IgA foram detectados em pacientes com as formas agudas da doença de Chagas, contudo não ultrapassando a 60% por qualquer uma das reações aqui analisadas. Em formas crônicas, esses anticorpos foram também encontrados, porém em proporções menores.

Uma pequena porcentagem de pacientes com febre reumática e sífilis apresentaram baixa reatividade para anticorpos IgA, pelas técnicas de IFI-E e IFI-A.

6. NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG, IgM e IgA DETECTADOS NAS TÉCNICAS DE DOT-ELISA COM DIFERENTES TIPOS DE ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI.

O nível de anticorpos IgG, IgM e IgA detectados nas técnicas de IFI (E e A), Dot-ELISA (As e At) e Dot-ELISA (Es) no estudo de soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos foi expresso em termos de média geométrica dos títulos (Tabela II), baseando-se nos dados das Figuras 2, 6 e 10.

Na reação de Imunofluorescência Indireta com forma amastigota do Trypanosoma cruzi os níveis de anticorpos IgG, M e A foram mais elevados quando comparados com os da reação com a forma epimastigota, conforme mostram as Figuras 2, 6, 10 e Tabela II.

Os altos níveis de anticorpos detectados pela IFI-A indicam a maior reatividade antigênica da forma amastigota do Trypanosoma cruzi, que parece estar, provavelmente, expressando epítomos de membrana mais reativos quando comparadas com as formas epimastigotas.

Na técnica de Dot-ELISA, com a forma amastigota (Dot-As, Dot-At) e com a forma epimastigota (Dot-Es) os níveis de anticorpos IgG foram bastante semelhantes. Enquanto que para anticorpos da classe IgA, pela Dot-At a reatividade encontrada foi ligeiramente superior a da Dot-As (Figuras 2 e 14 e Tabela II).

Tabela III - Média geométrica dos títulos de anticorpos IgG, IgM e IgA, anti-*Trypanosoma cruzi*, obtidos em 215 soros de indivíduos com diferentes formas clínicas, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Testes utilizados	Formas clínicas							
	Chagásicos					Não chagásicos		
	Aguda	Crônica				Normais	Outras infecções	Total
		Indeter.	Card.	Digest.	Total			
(IgG)								
IFI-E	75	338	373	170	381	2	3	2,2
IFI-A	520	1245	1575	935	1528	6	9	6,4
Dot-As	422	2705	2560	2720	2280	6	19	7,4
Dot-At	597	3152	3377	3980	2907	24	27	23,9
Dot-Es*	640	1974	2807	2764	2211	20	20	20
(IgM)								
IFI-E	131	3,5	3,4	7	4,8	1	1,5	1,2
IFI-A	452	6	6,8	15	9,4	3,5	3	3,4
Dot-As	298	2	2	2	3,2	2	2	2
Dot-At	221	2	1,5	2	2,5	2	1,5	1,7
(IgA)								
IFI-E	8	2	2,3	2,4	3	1	1,5	1,1
IFI-A	17,5	3	7,7	6,5	5,6	1	2,5	1,5
Dot-As	3	2	2,5	1	2,2	1	1	1
Dot-At	14	2	3	1	2,7	1	1,7	1,3

*Utilização de 68 soros

7. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA CAPACIDADE DISCRIMINATIVA, ENTRE PACIENTES CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS, DAS TÉCNICAS DE IFI-A E DOT-ELISA (As, At e Es) EM RELAÇÃO À IFI-E, ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG, IgM e IgA.

A análise de variância foi realizada com a finalidade de avaliar as diferenças entre os grupos de indivíduos estudados quanto aos títulos de anticorpos, a um nível de significância de 5% ($p=0,05$) e os resultados por não serem paramétricos, foram submetidos inicialmente a uma análise de Kruskal-Wallis, que mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Realizou-se, no entanto, o teste de análise de variância paramétrico com o objetivo de determinar os intervalos de confiança de 95% ($p=0,05$). Pela amostragem analisada, verificou-se o número de graus de liberdade entre os grupos (gl_e) de 8 e dentro dos grupos (gl_d) de 206, estabelecendo-se o valor de 1,94 para F crítico (F_c). Como os resultados desta análise apresentaram valores maiores que 1,94 (Tabelas 4, 5, e 6 do anexo), concluímos que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Neste estudo, os títulos obtidos pelas reações estudadas para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA, foram transformados em $\log (1 + \text{título})$.

Foram analisados 215 soros distribuídos em grupos de pacientes chagásicos (forma aguda e crônica) e não chagásicos (normais e outras afecções), sendo omitidos desta análise, os pacientes com leishmaniose visceral.

As médias e intervalos de confiança dos títulos de anticorpos IgG (Figura 16 e Tabela 4 do anexo), obtidos pelas técnicas de IFI (E e A) e Dot-ELISA (As, At e Es), mostram que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de indivíduos chagásicos e não chagásicos ($p < 0,0001$).

As médias e intervalos de confiança dos títulos de anticorpos IgM (Figura 17 e Tabela 5 do anexo), obtidos pelas técnicas de IFI (E e A) e Dot-ELISA (As e At), mostram que houve uma discriminação estatisticamente significativa entre grupos de pacientes com infecção chagásica aguda dos demais grupos estudados ($p < 0,0001$), indicando a predominância de anticorpos IgM neste grupo .

As médias e intervalos de confiança dos títulos de anticorpos IgA, obtidos pelas técnicas acima mencionadas (Figura 18 e Tabela 6 do anexo), mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre grupo de pacientes chagásicos dos demais grupos estudados, apesar da maior dispersão verificada no grupo de pacientes com infecção chagásica aguda.

Figura 16 - Médias e intervalos de 95% de confiança dos títulos transformados em log (1 + título) de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

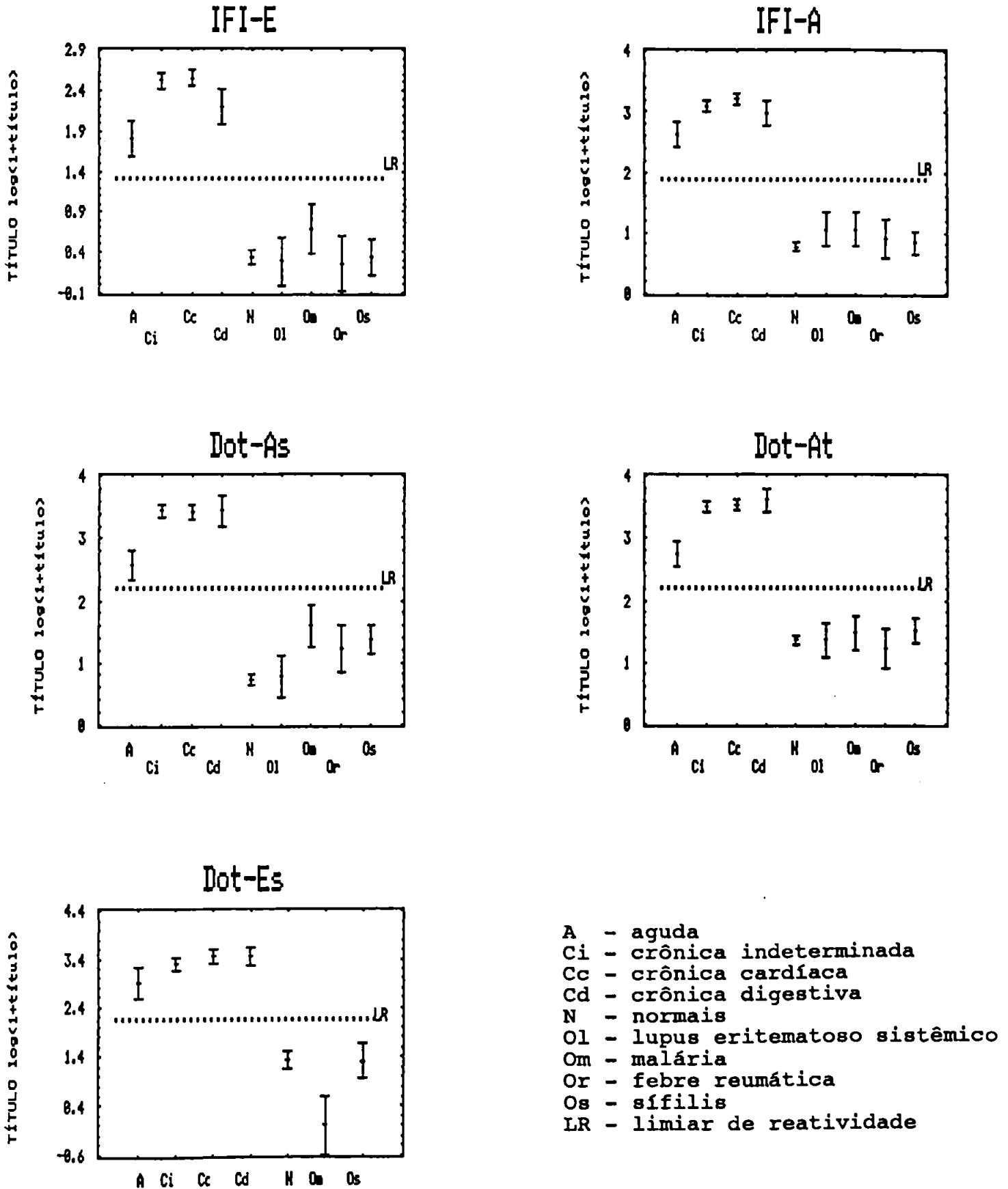
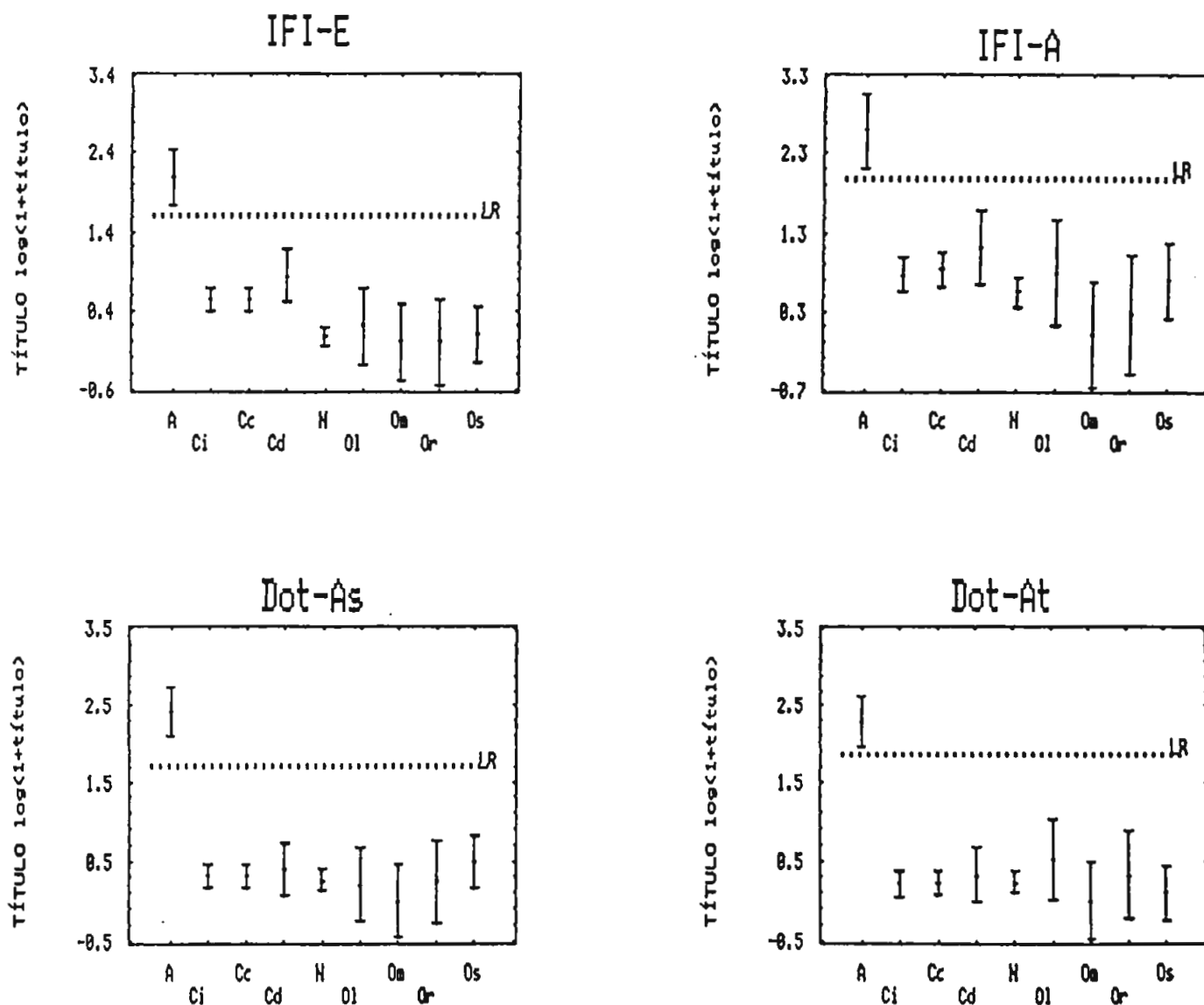
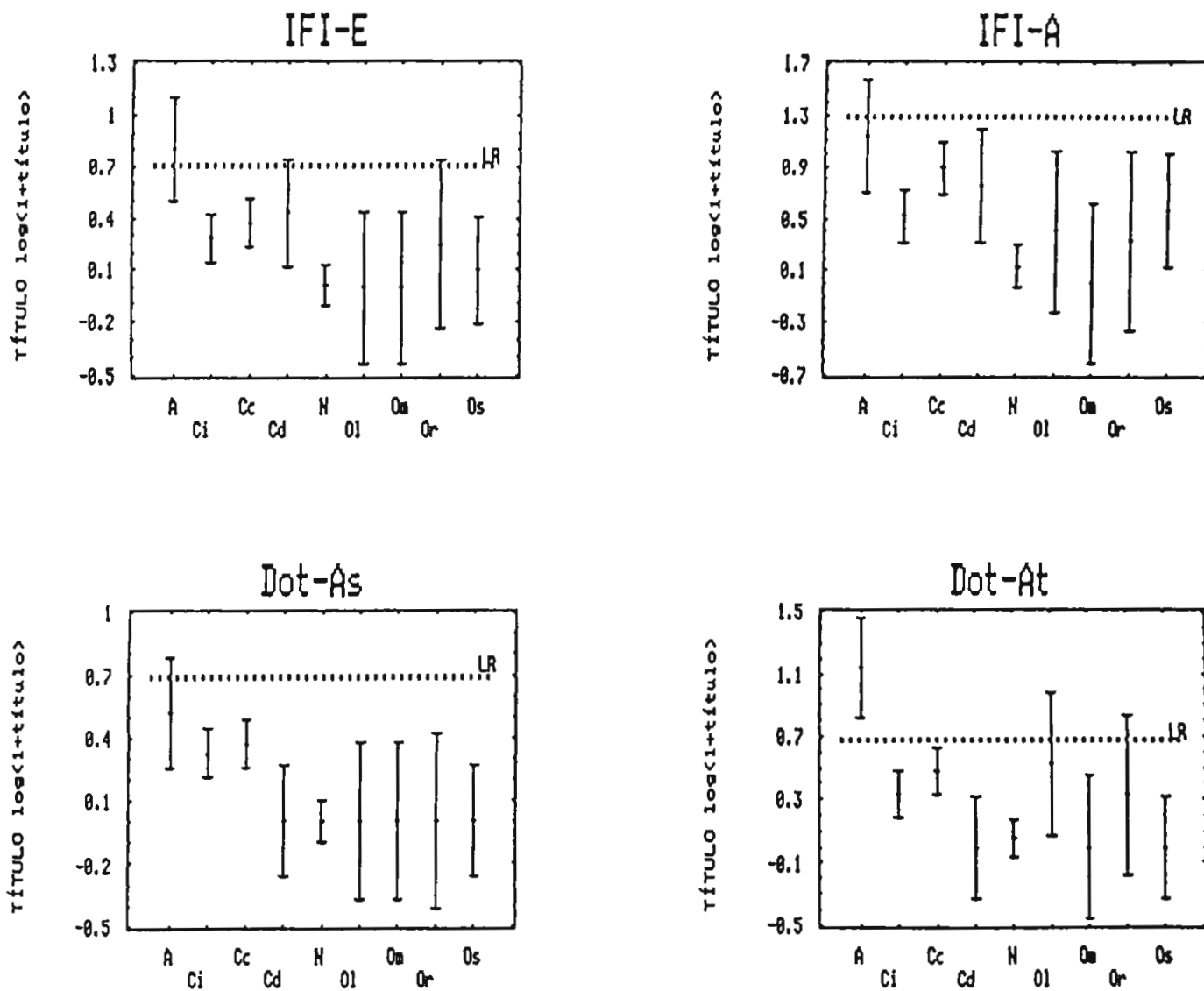


Figura 17 - Médias e intervalos de 95% de confiança dos títulos transformados em log (1 + título) de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi*, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.



A - aguda
 Ci - crônica indeterminada
 Cc - crônica cardíaca
 Cd - crônica digestiva
 N - normais
 Ol - lupus eritematoso sistêmico
 Om - malária
 Or - febre reumática
 Os - sífilis
 LR - limiar de reatividade

Figura 18 - Médias e intervalos de 95% de confiança dos títulos transformados em log (1 + título) de anticorpos IgA anti-*Trypanosoma cruzi*, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.



A - aguda
 Ci - crônica indeterminada
 Cc - crônica cardíaca
 Cd - crônica digestiva
 N - normais
 Ol - lupus eritematoso sistêmico
 Om - malária
 Or - febre reumática
 Os - sífilis
 LR - limiar de reatividade

8. CORRELAÇÃO ENTRE OS TÍTULOS DE ANTICORPOS OBSERVADOS NAS TÉCNICAS DE IFI e DOT-ELISA.

A partir dos coeficientes da correlação linear de Pearson, resultantes das possíveis combinações entre os testes empregados para a detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA, em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, (Tabelas 7, 8 e 9 do anexo), foram obtidos os valores de r (raiz quadrada do coeficiente de correlação).

Pelo teste t de Student, foi verificado se havia dependência ou não dos valores de Y (título dos anticorpos na reação A) em função de X (título dos anticorpos na reação B). Estes valores são considerados significativos quando o t observado (t_o) for igual ou maior que o t crítico (t_c) consultado em tabela estatística.

Pela análise de regressão linear, foi possível obter as curvas resultantes da interpolação dos títulos entre os testes. As curvas de regressão linear são representadas por equações que possibilitam a estimativa dos títulos de Y , a partir dos títulos de X .

Os coeficientes de correlação obtidos entre títulos de anticorpos IgG oscilaram de +0,9518 a +0,9066 (Tabela 7 do anexo), sendo classificados como correlação positiva forte. Os valores de r e da equação da reta de regressão, assim como os valores de t observado (t_o), encontram-se a seguir relacionados:

Teste	r	t_o	Equação da reta
IFI-E x IFI-A	+0,9060	45,3	$Y = 0,54 + 1,00 X$
IFI-A x DOT-As	+0,8977	43,2	$Y = 0,06 + 1,05 X$
DOT-Asx DOT-At	+0,8770	38,9	$Y = 0,78 + 0,77 X$
IFI-A x DOT-At	+0,8729	38,2	$Y = 0,74 + 0,86 X$
IFI-E x DOT-At	+0,8469	34,3	$Y = 1,16 + 0,90 X$
IFI-E x DOT-As	+0,8456	34,1	$Y = 0,60 + 1,08 X$

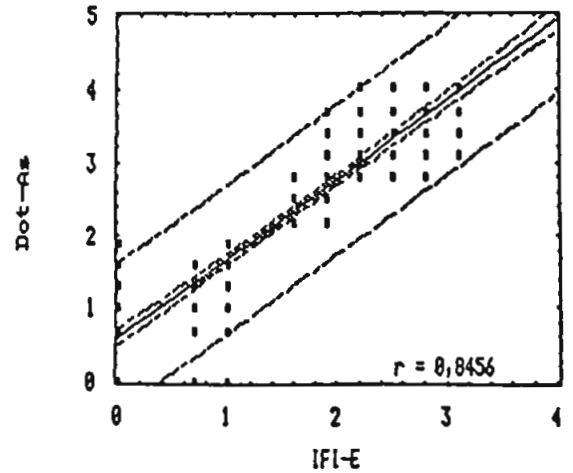
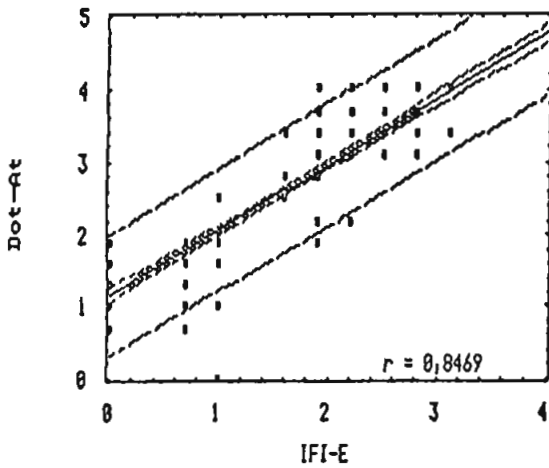
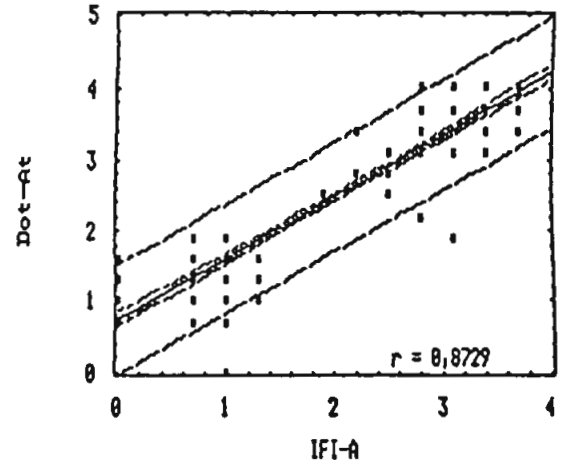
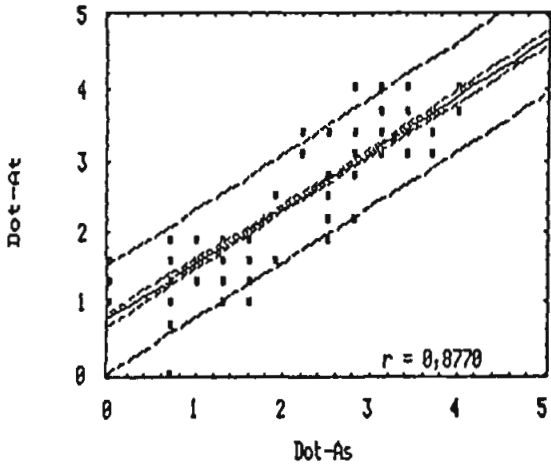
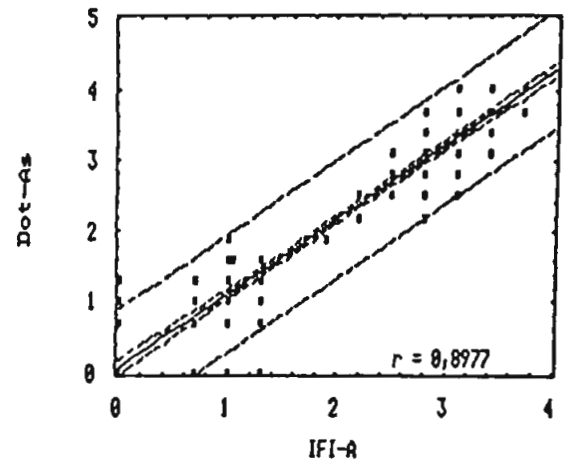
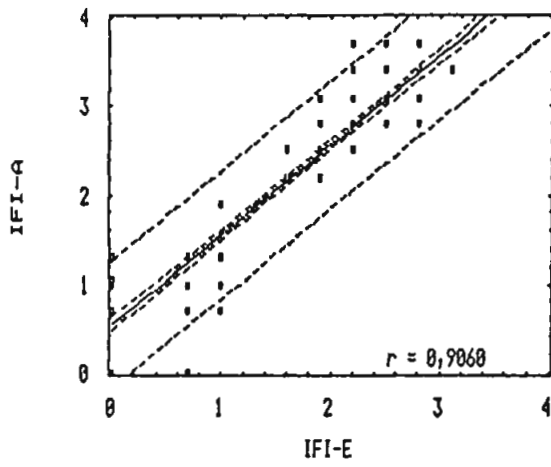
(Sendo $t_c = 1,96$; g.l. 213; $p < 0,00001$)

DOT-Asx DOT-Es	+0,8220	17,4	$Y = -0,15 + 1,03 X$
----------------	---------	------	----------------------

(Sendo $t_c = 1,98$; g.l. 66; $p < 0,00001$)

As curvas de regressão linear, obtidas entre títulos de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi, estão representadas na Figura 19.

Figura 19 - Curva da regressão linear entre títulos de anticorpos IgG, anti-Trypanosoma cruzi, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.



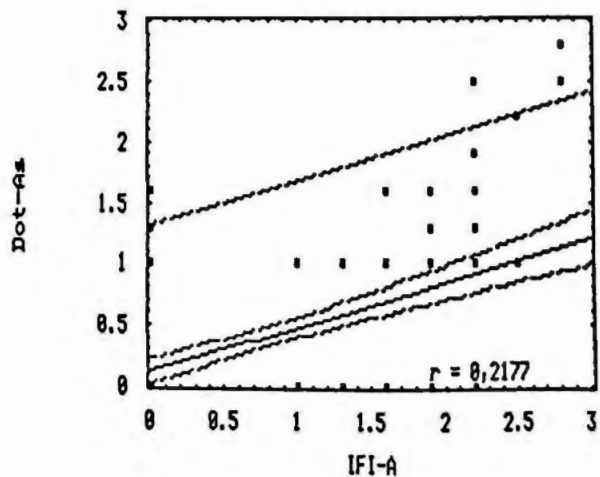
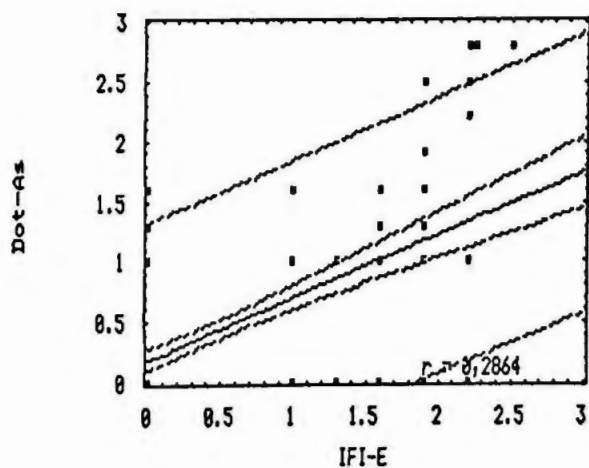
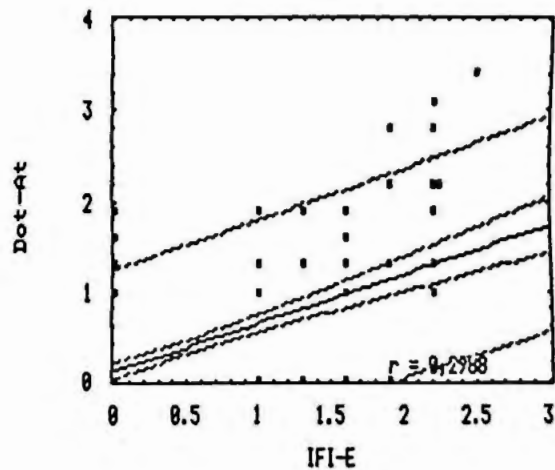
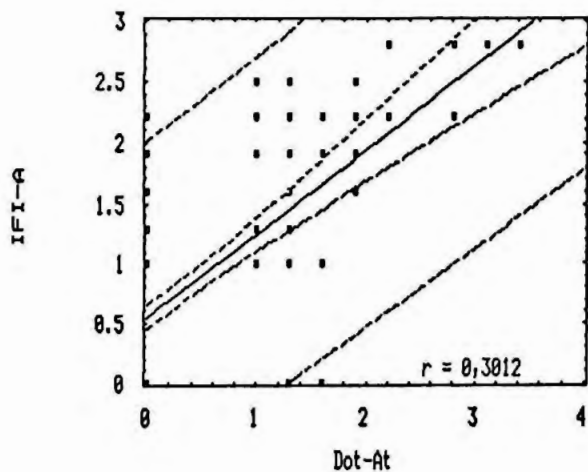
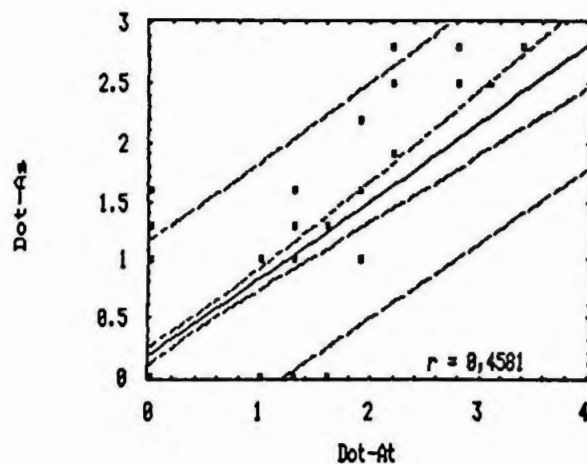
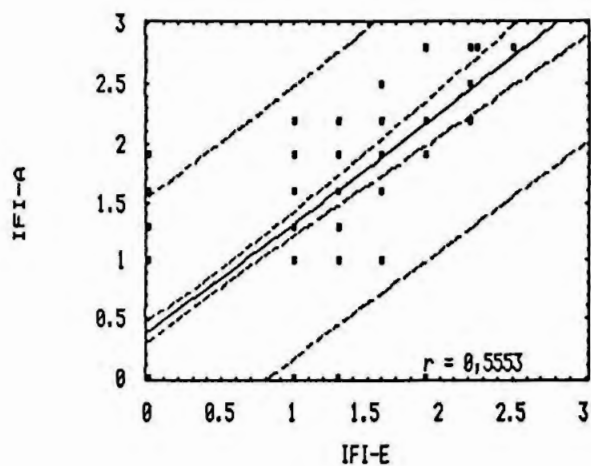
Os coeficientes de correlação, obtidos entre títulos de anticorpos IgM, foram melhores entre IFI-E e IFI-A e entre DOT-As e DOT-At (Tabela 8 do anexo). Os valores de r e da equação da reta, assim como os valores de t_0 , encontram-se a seguir relacionados.

Teste	r	t_0	Equação da reta
IFI-E x IFI-A	+0,5553	16,31	$Y = 0,38 + 0,93 X$
DOT-Atx DOT-As	+0,4581	13,41	$Y = 0,18 + 0,65 X$
DOT-Atx IFI-A	+0,3012	9,58	$Y = 0,55 + 0,69 X$
IFI-E x DOT-At	+0,2988	9,52	$Y = 0,09 + 0,54 X$
IFI-E x DOT-As	+0,2864	9,24	$Y = 0,18 + 0,51 X$
IFI-A x DOT-As	+0,2177	7,69	$Y = 0,12 + 0,36 X$

(Sendo $t_c = 1,96$; g.l. 213; $p < 0,00001$)

As curvas de regressão linear das correlações obtidas entre títulos de anticorpos IgM anti-Trypanosoma cruzi, encontram-se na Figura 20.

Figura 20 - Curva da regressão linear entre títulos de anticorpos IgM, anti-Trypanosoma cruzi, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.



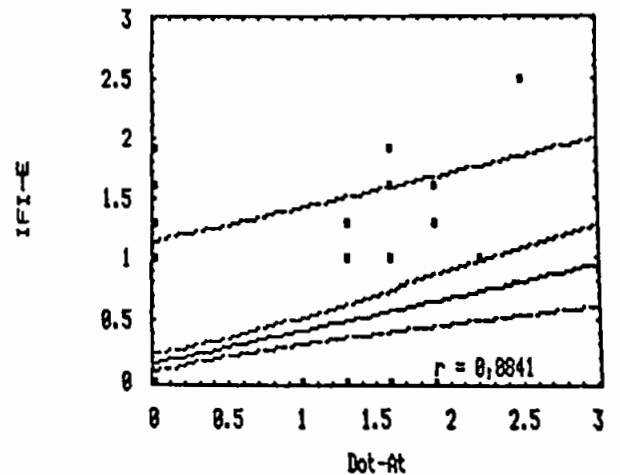
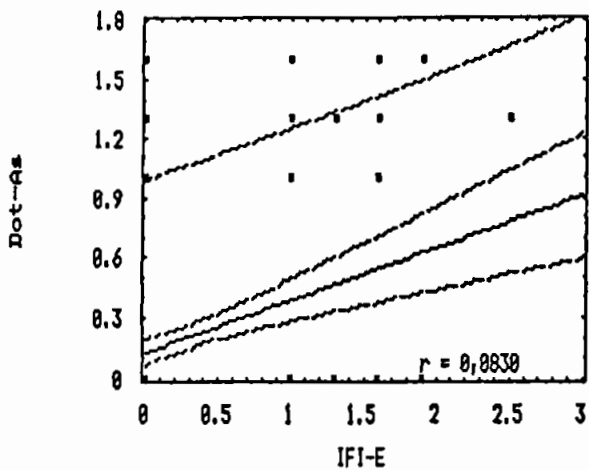
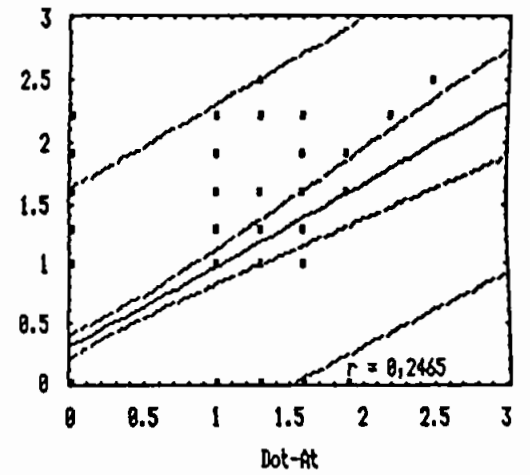
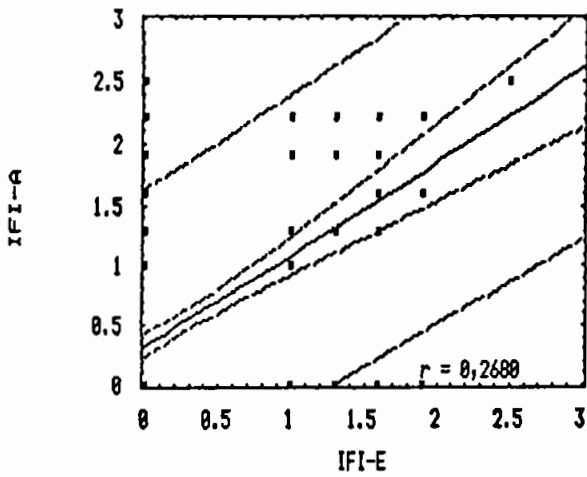
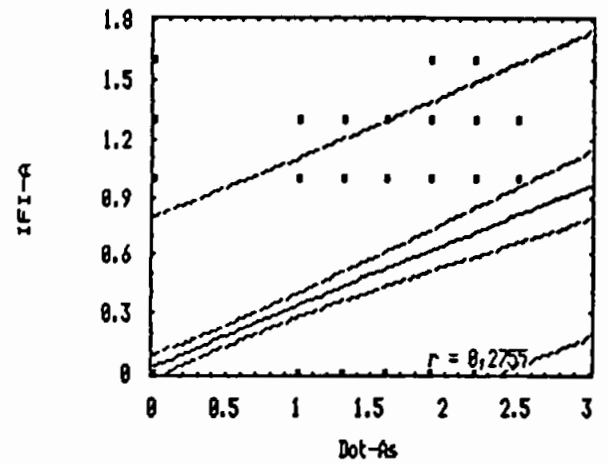
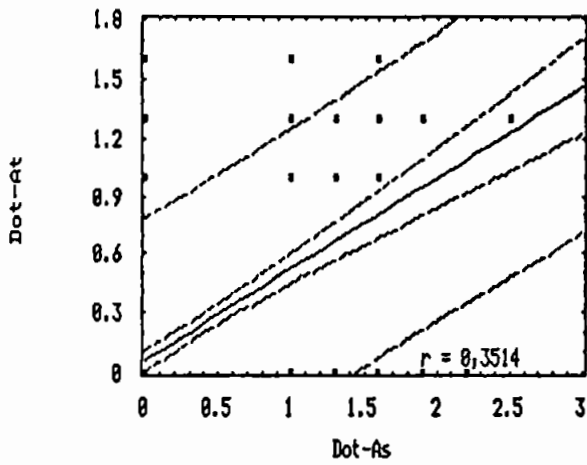
Os coeficientes de correlação, obtidos entre títulos de anticorpos IgA, foram melhores entre DOT-As e DOT-At e entre DOT-As e IFI-A (Tabela 9 do anexo). Os valores de r e da equação da reta, assim como os valores de t_0 , estão a seguir relacionados.

Teste	r	t_0	Equação da reta
DOT-Asx DOT-At	+0,3514	10,74	$Y = 0,05 + 0,46 X$
DOT-Asx IFI-A	+0,2755	8,99	$Y = 0,03 + 0,31 X$
IFI-E x IFI-A	+0,2680	8,82	$Y = 0,32 + 0,75 X$
DOT-Atx IFI-A	+0,2465	8,34	$Y = 0,31 + 0,66 X$
IFI-E x DOT-As	+0,0830	4,56	$Y = 0,12 + 0,25 X$
DOT-Atx IFI-E	+0,0841	4,42	$Y = 0,15 + 0,26 X$

(Sendo $t_c = 1,96$; g.l. 213; $p < 0,00002$)

As curvas de regressão linear das correlações obtidas entre títulos de anticorpos IgA anti-Trypanosoma cruzi, podem ser observadas na Figura 21.

Figura 21 - Curva da regressão linear entre títulos de anticorpos IgA, anti-*Trypanosoma cruzi*, obtidos em 215 soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.



9. REPRODUTIBILIDADE DA TÉCNICA DE DOT-ELISA (Dot-As)

O estudo da reprodutibilidade intra-teste e inter-teste da técnica de Dot-ELISA foi efetuado para determinar as variabilidades que pudessem ocorrer durante o desenvolvimento do nosso trabalho.

A verificação da reprodutibilidade intra-teste foi feita baseando-se nos resultados obtidos em 5 membranas testadas no mesmo dia, e a reprodutibilidade inter-teste, em 20 membranas, testadas em 5 dias diferentes, com 2 partidas diferentes de antígeno As.

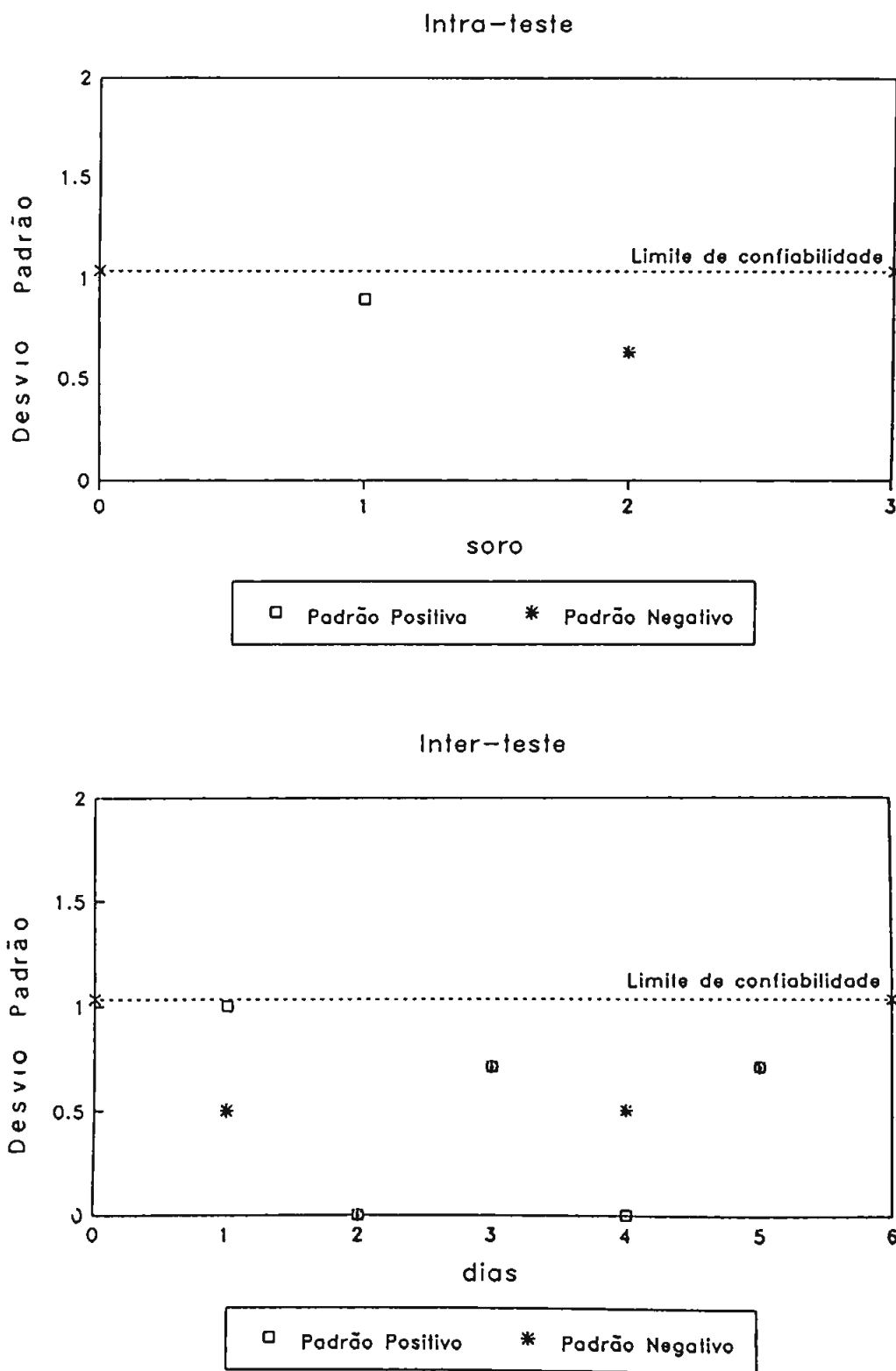
O limiar de confiabilidade estabelecido tanto para os ensaios intra-testes como para os inter-testes foi determinado pela média dos desvios-padrão obtidos de 50 testes realizados com soros-padrão positivo e negativo.

Os desvios médios de 0,894 e 0,632 foram obtidos para os ensaios intra-testes e de 1,0 a 0 nos ensaios inter-testes, respectivamente para soros positivos e negativos.

Estes estudos mostraram que a reprodutibilidade das reações pode ser observada no mesmo dia, como em dias diferentes, pois todos os desvios-padrão obtidos encontram-se abaixo do limiar de confiabilidade estipulado, como mostra a Figura 22.

As Tabelas 10 e 11 do anexo, apresentam os dados que correspondem a este estudo.

Figura 22 - Reprodutibilidade intra-teste e inter-teste da técnica de Dot-As na detecção de anticorpos da classe IgG.



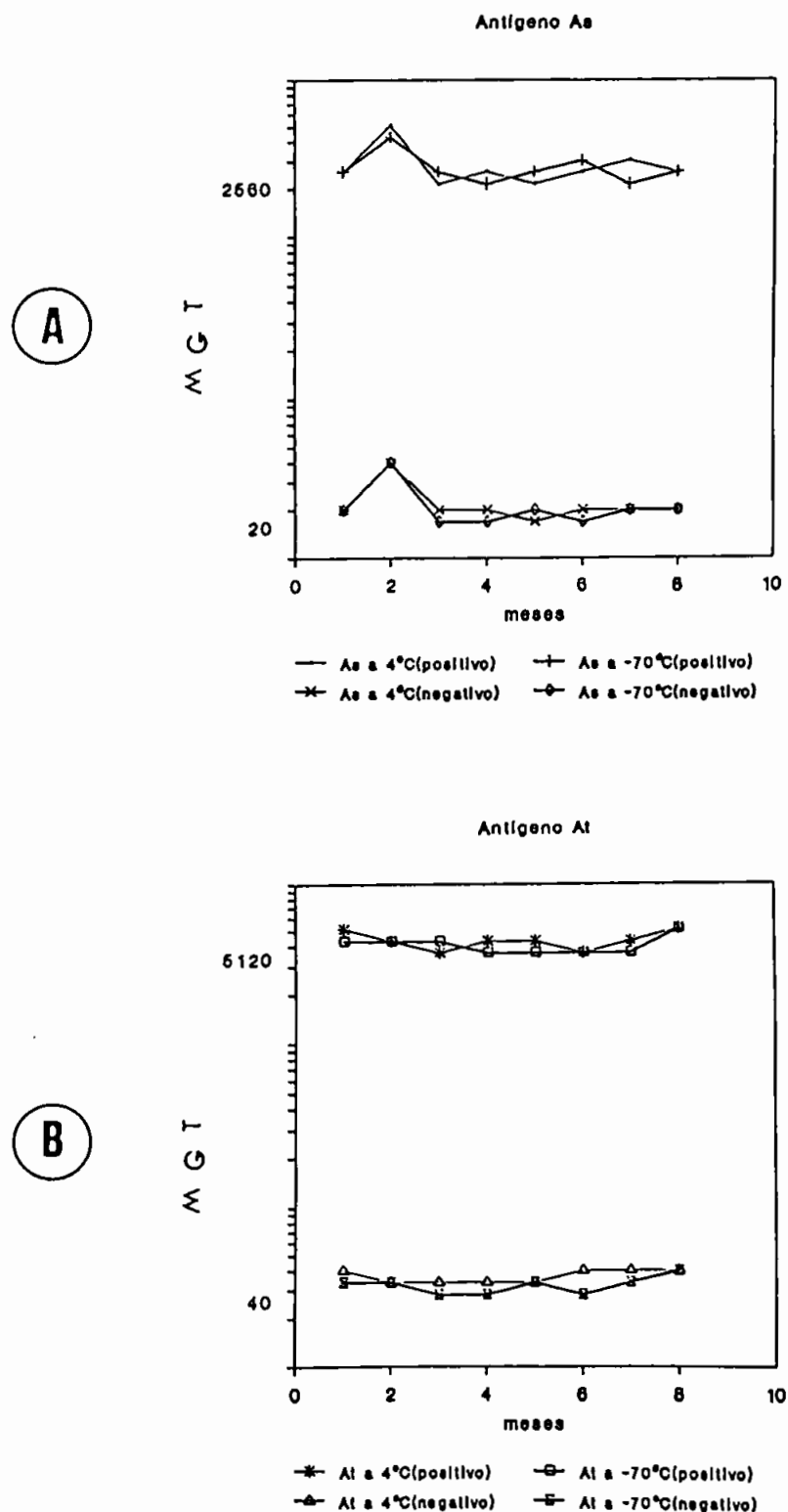
10. ESTABILIDADE DOS ANTÍGENOS EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE NA TÉCNICA DE DOT-ELISA.

O estudo da estabilidade consistiu em se verificar mensalmente a reatividade dos antígenos (As e At) aplicados na membrana de nitrocelulose e conservadas a 4 °C e a -70°C, utilizando-se os soros controles positivo e negativo em quadruplicata. Os resultados expressos em média geométrica dos títulos (MGT) foram comparados com a MGT dos soros-padrão.

O antígeno As manteve sua reatividade inalterada por até 8 meses, tanto a 4°C como a -70°C (Figura 23 A). O antígeno At apresentou reações com pontos de coloração heterogêneos, a partir do primeiro mês, sem contudo, demonstrar alterações dos resultados em títulos (Figura 23 B).

Os dados obtidos nesta análise estão expressos na Tabelas 12 e 13 do anexo.

Figura 23 - Estabilidade dos antígenos solúvel (As) e total (At), da forma amastigota do *Trypanosoma cruzi* em membrana de nitrocelulose (respectivamente Figs.A e B), na detecção de anticorpos IgG pela técnica de Dot-ELISA.



11. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS POLIPEPTÍDEOS DE FORMAS AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS DO TRYPANOSOMA CRUZI RECONHECIDOS POR SOROS DE INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS PELA TÉCNICA DE "IMMUNOBLOTTING".

Uma caracterização preliminar foi efetuada para verificar quais seriam os polipeptídeos dos antígenos E (Et e Es) e A (At e As) reconhecidos por diferentes soros na reação imunoenzimática de "immunoblotting".

As diferentes preparações antigênicas foram obtidas como descritas no item 6.2. de material e métodos, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e transferidas para membrana de nitrocelulose, para posterior reação de "immunoblotting".

As tiras de nitrocelulose contendo os diferentes antígenos solúvel e total das formas epimastigotas e amastigotas, foram analisadas frente aos mesmos soros para a detecção dos anticorpos das classes IgG e IgM, por "immunoblotting".

As Figuras 24 A e A', correspondentes aos antígenos total de formas amastigota e de epimastigota, mostram que há reconhecimento de vários polipeptídeos por anticorpos da classe IgG dos soros de pacientes chagásicos crônicos (linhas b-f), e em menor número, de um soro de paciente chagásico agudo (linha a). Os soros normais reconhecem no máximo seis polipeptídeos (linhas g-i).

As Figuras 24 B e B' mostram que há predominância do reconhecimento de polipeptídeos acima de 43 kDa para os antígenos preparados com a forma epimastigota (Es), e abaixo de 43 kDa para os antígenos da forma amastigota (As), para os mesmos soros chagásicos crônicos na detecção de anticorpos da classe IgG (linhas b-f). Comportamento semelhante foi verificado com o soro de paciente chagásico agudo, embora o seu reconhecimento fosse menos complexo (linha a).

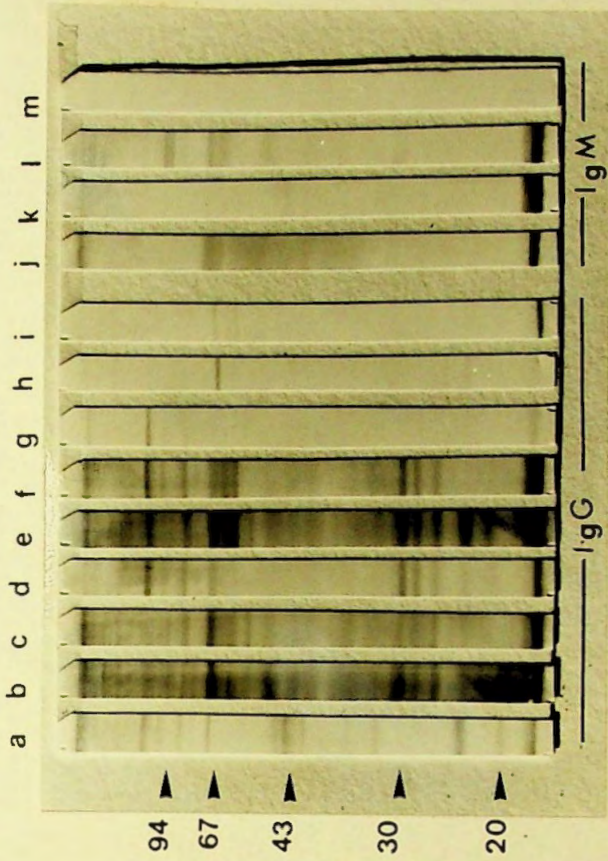
Os soros negativos não reconhecem nenhum polipeptídeo com estes antígenos: Figura B (g-i) e Figura B' (g-h).

Os polipeptídeos dos antígenos de amastigotas (At e As) são mais facilmente reconhecidos por anticorpos da classe IgM dos soros de pacientes chagásicos na fase aguda, do que quando utilizamos extratos da forma epimastigota do Trypanosoma cruzi.

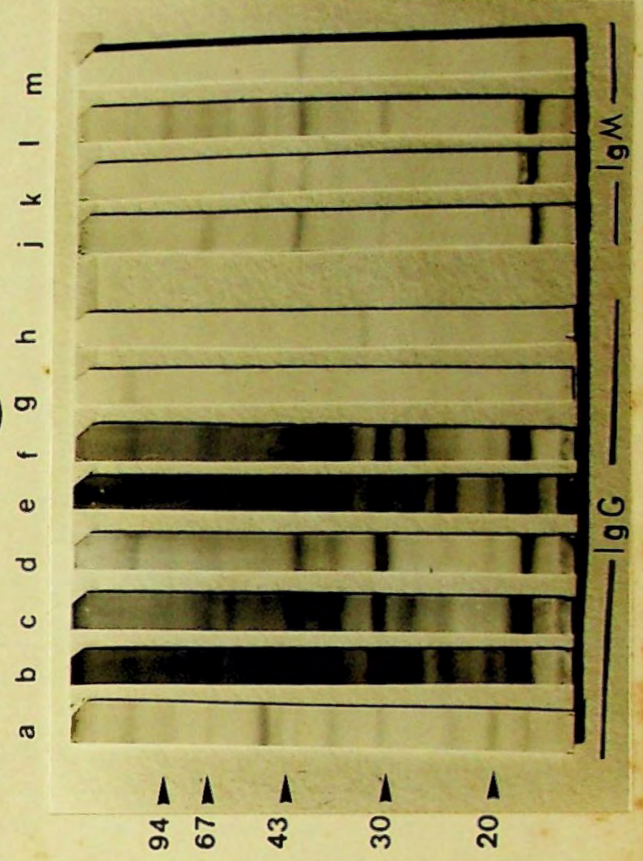
Figura 24 - Caracterização por "Immunoblotting" da reatividade dos antígenos total e solúvel das formas amastigota (At, As) e epimastigota (Et, Es) do Trypanosoma cruzi frente à soros de pacientes com infecção chagásica aguda e crônica.

- A - antígeno total da forma amastigota (At)
 - A' - antígeno total da forma epimastigota (Et)
 - B - antígeno solúvel da forma amastigota (As)
 - B' - antígeno solúvel da forma epimastigota (Es)
- a a i - conjugado anti-IgG humano
j a m - conjugado anti-IgM humano
- a - soro de paciente na fase aguda
b a f - soro de paciente na fase crônica
g a i - soro normal
j a l - soro de paciente na fase aguda
m - soro normal

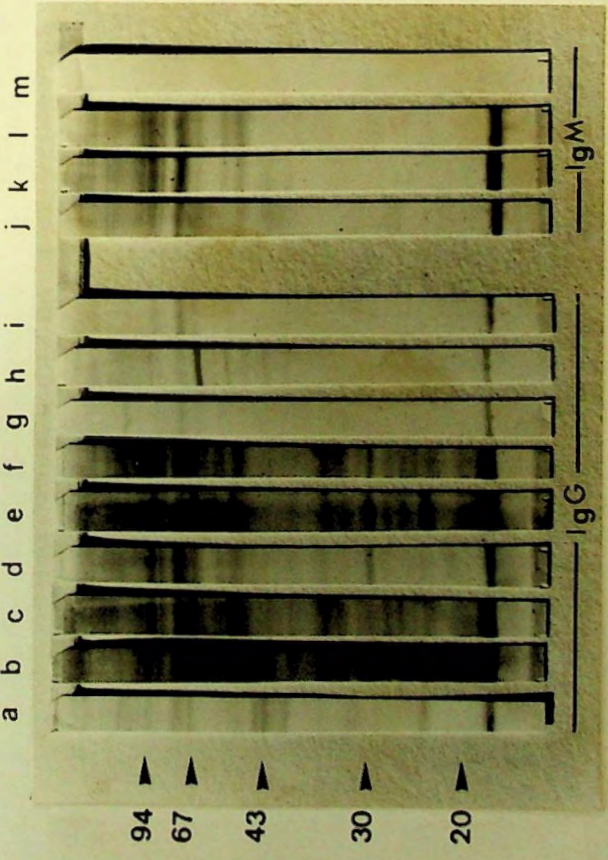
A'



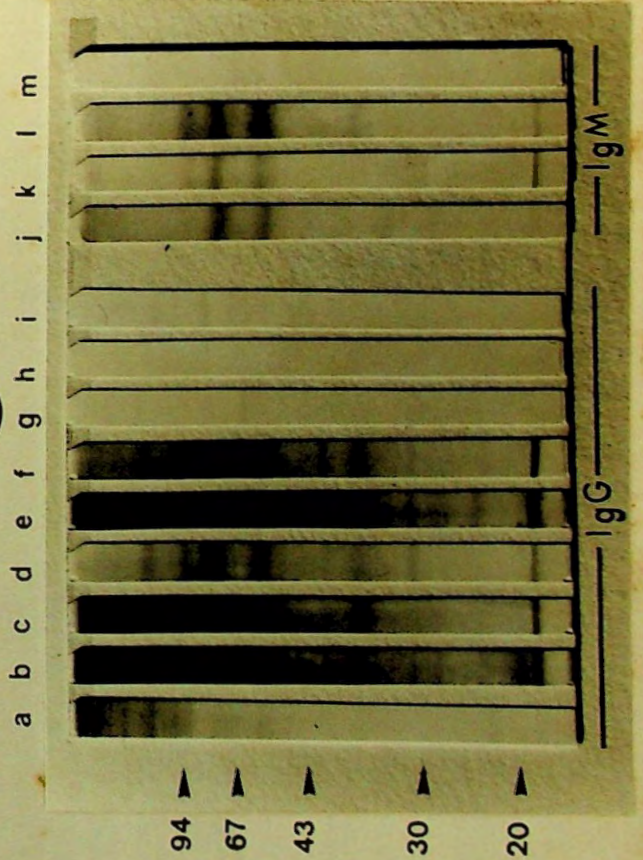
B'



A



B



A N E X O S

TABELA 1 - Valores relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo e falso negativo, de acordo com o limiar de reatividade estabelecido para detecção de anticorpos IgG, anti-T.cruzi, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Índice	IFI-E*	IFI-A*	Dot-As*	Dot-At*
Limiar de Reatividade (Título)	20	80	160	160
Sensibilidade(%)	100 (120/120)	100 (120/120)	100 (120/120)	99,1 (119/120)
Especificidade(%)	100 (95/95)	100 (95/95)	100 (95/95)	100 (95/95)
Eficiência(%)	100	100	100	99,5
Valor preditivo Positivo(%)	100	100	100	100
Valor preditivo Negativo(%)	100	100	100	98,9
Falso-Positivo(%)	0	0	0	0
Falso-Negativo(%)	0	0	0	1

*E epimastigota, A amastigota, As antígeno solúvel de amastigota e At antígeno total de amastigota

TABELA 2 - Valores relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo e falso negativo, de acordo com o limiar de reatividade estabelecido para detecção de anticorpos IgM, anti-T.cruzi, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA

Índice	IFI-E*	IFI-A*	Dot-As*	Dot-At*
Limiar de Reatividade (Título)	40	160	40	80
Sensibilidade(%)	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	90 (9/10)
Especificidade(%)	100 (95/95)	100 (95/95)	95,8 (91/95)	97,9 (93/95)
Eficiência(%)	100	100	96,2	97,1
Valor preditivo Positivo(%)	100	100	71,4	81,9
Valor preditivo Negativo(%)	100	100	100	98,9
Falso-Positivo(%)	0	0	28,5	18,2
Falso-Negativo(%)	0	0	0	1

*E epimastigota, A amastigota, As antígeno solúvel de amastigota e At antígeno total de amastigota

Tabela 3 - Valores relativos de sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falso positivo e falso negativo, de acordo com o limiar de reatividade estabelecido para detecção de anticorpos IgA, anti-T.cruzi, nas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Índice	IFI-E*	IFI-A*	Dot-As*	Dot-At*
Limiar de Reatividade (Título)	5	20	5	5
Sensibilidade(%)	32,5 (39/120)	36,6 (44/120)	33,3 (40/120)	38,3 (46/120)
Especificidade(%)	93,7 (89/95)	93,7 (89/95)	100 (95/95)	94,7 (95/95)
Eficiência(%)	59,5	61,9	62,8	63,2
Valor preditivo Positivo(%)	86,6	88,8	100	90,2
Valor preditivo Negativo(%)	52,5	53,9	54,3	54,9
Falso-Positivo(%)	13,4	12,0	0	9,8
Falso-Negativo(%)	47,7	46,0	45,7	45,2

* E epimastigota, A amastigota, As antígeno solúvel de amastigota e At antígeno total de amastigota

Tabela 4 - Médias e intervalos com 95% de confiança dos títulos de anticorpos IgG, anti-*T. cruzi*, codificados em $\log(1 + \text{título})$, obtidos em 215 soros de indivíduos com diferentes formas clínicas, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Formas clínicas	Técnicas			
	IFI-E(IgG)	IFI-A(IgG)	Dot-As(IgG)	Dot-At(IgG)
DOENÇA DE CHAGAS				
Aguda	1,812 (1,595 — 2,029)	2,625 (2,423 — 2,827)	2,565 (2,325 — 2,804)	2,745 (2,547 — 2,944)
Crônica indeterminada	2,529 (2,432 — 2,626)	3,089 (2,998 — 3,179)	3,438 (3,331 — 3,545)	3,498 (3,409 — 3,587)
Crônica cardíaca	2,565 (2,468 — 2,662)	3,209 (3,119 — 3,299)	3,420 (3,313 — 3,527)	3,540 (3,451 — 3,629)
Crônica digestiva	2,204 (1,987 — 2,420)	2,986 (2,784 — 3,188)	3,438 (3,198 — 3,677)	3,618 (3,420 — 3,817)
NORMAIS	0,334 (0,253 — 0,416)	0,765 (0,689 — 0,840)	0,737 (0,647 — 0,827)	1,363 (1,288 — 1,437)
OUTRAS INFECÇÕES				
Febre reumática	0,250 (-0,092 — 0,592)	0,900 (0,581 — 1,219)	1,225 (0,847 — 1,604)	1,225 (0,912 — 1,539)
Sífilis	0,339 (0,122 — 0,556)	0,830 (0,628 — 1,031)	1,361 (1,121 — 1,600)	1,511 (1,313 — 1,710)
Doença auto-imune	0,279 (-0,027 — 0,586)	1,060 (0,774 — 1,345)	1,602 (0,441 — 1,119)	1,481 (1,080 — 1,641)
Malária	0,679 (0,372 — 0,986)	1,060 (0,774 — 1,345)	1,602 (1,260 — 1,940)	1,481 (1,201 — 1,762)

$F_{\text{observado}} = 250,89$ para IFI-E; $334,47$ para IFI-A; $289,36$ para Dot-As e $292,06$ para Dot-At; sendo $F_{\text{crítico}} = 1,94$ para $gl_e = 8$ e $gl_d = 206$; $p < 0,0001$.

Tabela 5- Médias e intervalos com 95% de confiança dos títulos de anticorpos IgM, anti-*T. cruzi*, codificados em $\log(1 + \text{título})$, obtidos em 215 soros de indivíduos com diferentes formas clínicas, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Formas clínicas	Técnicas			
	IFI-E(IgM)	IFI-A(IgM)	Dot-As(IgM)	Dot-At(IgM)
DOENÇA DE CHAGAS				
Aguda	2,088 (1,745 — 2,431)	2,595 (2,113 — 3,077)	2,414 (2,092 — 2,737)	2,284 (1,940 — 2,628)
Crônica indeterminada	0,530 (0,377 — 0,683)	0,765 (0,549 — 0,980)	0,316 (0,171 — 0,460)	0,214 (0,060 — 0,367)
Crônica cardíaca	0,532 (0,379 — 0,685)	0,833 (0,617 — 1,048)	0,320 (0,175 — 0,464)	0,220 (0,066 — 0,373)
Crônica digestiva	0,840 (0,497 — 1,183)	1,111 (0,630 — 1,593)	0,400 (0,077 — 0,722)	0,320 (-0,023 — 0,664)
NORMAIS	0,069 (-0,059 — 0,542)	0,542 (0,361 — 0,723)	0,267 (0,146 — 0,388)	0,236 (0,107 — 0,365)
OUTRAS INFECÇÕES				
Febre reumática	0 (-0,542 — 0,542)	0,250 (-0,511 — 1,011)	0,250 (-0,260 — 0,760)	0,325 (-0,218 — 0,868)
Sífilis	0,100 (-0,243 — 0,443)	0,690 (0,208 — 1,171)	0,500 (0,177 — 0,822)	0,100 (-0,243 — 0,443)
Doença auto-imune	0,200 (-0,285 — 0,685)	0,780 (0,099 — 1,461)	0,200 (-0,256 — 0,656)	0,520 (0,034 — 1,006)
Malária	0 (-0,485 — 0,485)	0 (-0,681 — 0,681)	0 (-0,456 — 0,456)	0 (-0,486 — 0,486)

$F_{\text{observado}} = 17,538$ para IFI-E; 8,9 para IFI-A; 20,40 para Dot-As e 17,0 para Dot-At; sendo $F_{\text{crítico}} = 1,94$ para $gl_e = 8$ e $gl_d = 206$; $p < 0,0001$.

Tabela 6 - Médias e intervalos com 95% de confiança dos títulos de anticorpos IgA, anti-*T. cruzi*, codificados em $\log(1 + \text{título})$, obtidos em 215 soros de indivíduos com diferentes formas clínicas, pelas técnicas de IFI e Dot-ELISA.

Formas clínicas	Técnicas			
	IFI-E(IgA)	IFI-A(IgA)	Dot-As(IgA)	Dot-At(IgA)
DOENÇA DE CHAGAS				
Aguda	0,801 (0,493 — 1,108)	1,141 (0,701 — 1,582)	0,520 (0,256 — 0,784)	1,141 (0,819 — 1,464)
Crônica indeterminada	0,286 (0,148 — 0,423)	0,520 (0,323 — 0,717)	0,326 (0,208 — 0,444)	0,328 (0,183 — 0,472)
Crônica cardíaca	0,368 (0,230 — 0,506)	0,889 (0,692 — 1,086)	0,372 (0,254 — 0,490)	0,478 (0,334 — 0,622)
Crônica digestiva	0,430 (0,122 — 0,737)	0,760 (0,319 — 1,200)	0 (-0,263 — 0,263)	0 (-0,322 — 0,322)
NORMAIS	0,014 (-0,101 — 0,129)	0,125 (-0,039 — 0,290)	0 (-0,098 — 0,098)	0,050 (-0,070 — 0,171)
OUTRAS INFECCÕES				
Febre reumática	0,250 (-0,236 — 0,736)	0,325 (-0,371 — 1,021)	0 (-0,416 — 0,416)	0,325 (-0,184 — 0,835)
Sífilis	0,100 (-0,207 — 0,407)	0,560 (0,119 — 1,000)	0 (-0,263 — 0,263)	0 (-0,322 — 0,322)
Doença auto-imune	0 (-0,435 — 0,435)	0,400 (0,222 — 1,022)	0 (-0,372 — 0,372)	0,520 (0,064 — 0,976)
Malária	0 (-0,435 — 0,435)	0 (-0,622 — 0,622)	0 (-0,372 — 0,372)	0 (-0,456 — 0,456)

$F_{\text{observado}} = 4,5$ para IFI-E; $5,9$ para IFI-A; $5,2$ para Dot-As e $7,2$ para Dot-At; sendo $F_{\text{crítico}} = 1,94$ para $gl_e = 8$ e $gl_d = 206$; $p < 0,0001$.

Tabela 7 - Coeficiente de correlação entre os títulos de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi, obtidos pelas técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At, em 215 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos.

Técnicas	IFI-E	IFI-A	Dot-As	Dot-At
IFI-E	1,0000	0,9518	0,9196	0,9202
IFI-A	0,9518	1,0000	0,9475	0,9343
Dot-As	0,9196	0,9475	1,0000	0,9365
Dot-At	0,9202	0,9343	0,9365	1,0000

Tabela 8 - Coeficiente de correlação entre os títulos de anticorpos IgM anti-Trypanosoma cruzi, obtidos pelas técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At, em 215 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos.

Técnicas	IFI-E	IFI-A	Dot-As	Dot-At
IFI-E	1,0000	0,7452	0,5352	0,5466
IFI-A	0,7452	1,0000	0,4666	0,5488
Dot-As	0,5352	0,4666	1,0000	0,6768
Dot-At	0,5466	0,5488	0,6768	1,0000

Tabela 9 - Coeficiente de correlação entre os títulos de anticorpos IgA anti-Trypanosoma cruzi, obtidos pelas técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As e Dot-At em 215 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos.

Técnicas	IFI-E	IFI-A	Dot-As	Dot-At
IFI-E	1,0000	0,5176	0,2988	0,2900
IFI-A	0,5176	1,0000	0,5249	0,4965
Dot-As	0,2988	0,5249	1,0000	0,5928
Dot-At	0,2900	0,4965	0,5928	1,0000

Tabela 10 - Reprodutibilidade intra-teste verificada na detecção de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi, pela técnica de Dot-As.

Membrana	Soro Padrão positivo* Título	Desvio Padrão	Soro Padrão negativo** Título	Desvio Padrão
1	5120	+1	20	0
2	5120	+1	40	+1
3	5120	+1	20	0
4	5120	+1	20	0
5	2560	0	20	0
Desvio padrão médio		0,894		0,632

*Soro Padrão positivo - 2560

**Soro Padrão negativo - 20

Tabela 11 - Reprodutibilidade inter-teste verificada na detecção de anticorpos IgG, anti-*Trypanosoma cruzi*, pela técnica de Dot-As.

SOROS	DIAS				
	1	2	3	4	5
Padrão positivo*	5120	2560	5120	2560	5120
	5120	2560	2560	2560	5120
	5120	2560	2560	2560	2560
	5120	2560	1280	2560	2560
Desvio Padrão médio	1,0	0	0,71	0	0,71
Padrão negativo**	20	20	20	20	40
	40	20	20	20	40
	20	20	10	20	20
	20	20	10	40	20
Desvio Padrão médio	0,5	0	0,71	0,5	0,71

* Soro Padrão positivo - 2560

** Soro Padrão negativo - 20

desvio médio padrão (d.m.p.)= 0,47

Limiar de confiabilidade (2,2 x d.m.p.)= 1,034

Tabela 12 - Estabilidade verificada com o antígeno solúvel (As) da forma amastigota do Trypanosoma cruzi, na detecção de anticorpos IgG pela técnica de Dot-As.

Tempo (meses)	Soro Padrão Positivo*		Soro Padrão Negativo*	
	MGT**		MGT**	
	Temperatura 4°C	Temperatura -70°C	Temperatura 4°C	Temperatura -70°C
1	2560	2560	20	20
2	5120	4305	40	40
3	2152	2560	20	16,8
4	2560	2152	20	16,8
5	2152	2560	16,8	20
6	2560	3044	20	16,8
7	3044	2152	20	20
8	2560	2560	20	20

** MGT - Média Geométrica dos Títulos

* MGT do Soro Padrão positivo - 2560

* MGT do Soro Padrão negativo - 20

Tabela 13 - Estabilidade verificada com o antígeno total (At) da forma amastigota do *Trypanosoma cruzi*, na detecção de anticorpos IgG pela técnica de Dot-ELISA.

Tempo (meses)	Soro Padrão Positivo*		Soro Padrão Negativo*	
	MGT**		MGT**	
	Temperatura		Temperatura	
	4°C	-70°C	4°C	-70°C
1	5120	4305	40	33,6
2	4305	4305	33,6	33,6
3	3620	4305	33,6	28,3
4	4305	3620	33,6	28,3
5	4305	3620	33,6	33,6
6	3620	3620	40	28,3
7	4305	3620	40	33,6
8	5120	5120	40	40

** MGT - Média Geométrica dos Títulos

* MGT do Soro Padrão positivo - 5120

* MGT do Soro Padrão negativo - 40

Quadro 1 - Dados obtidos para o cálculo dos índices avaliadores das técnicas de IFI e Dot-ELISA para detecção de anticorpos da classe G

IFI-E	Positivo	Negativo	Total
Reagente	120	0	120
Não reagente	0	95	95
Total	120	95	215

IFI-A	Positivo	Negativo	Total
Reagente	120	0	120
Não reagente	0	95	95
Total	120	95	215

Dot-As	Positivo	Negativo	Total
Reagente	120	0	120
Não reagente	0	95	95
Total	120	95	215

Dot-At	Positivo	Negativo	Total
Reagente	119	1	120
Não reagente	0	95	95
Total	119	96	215

Quadro 2 - Dados obtidos para o cálculo dos índices avaliadores das técnicas de IFI e Dot-ELISA para detecção de anticorpos da classe M

IFI-E	Positivo	Negativo	Total
Reagente	10	0	10
Não reagente	0	95	95
Total	10	95	105

IFI-A	Positivo	Negativo	Total
Reagente	10	0	10
Não reagente	0	95	95
Total	10	95	105

Dot-As	Positivo	Negativo	Total
Reagente	10	0	10
Não reagente	4	91	95
Total	10	91	105

Dot-At	Positivo	Negativo	Total
Reagente	9	1	10
Não reagente	2	93	95
Total	11	94	105

Quadro 3 - Dados obtidos para o cálculo dos índices avaliadores das técnicas de IFI e Dot-ELISA para detecção de anticorpos da classe A

IFI-E	Positivo	Negativo	Total
Reagente	39	81	120
Não reagente	6	89	95
Total	45	170	215

IFI-A	Positivo	Negativo	Total
Reagente	44	76	120
Não reagente	6	89	95
Total	50	165	215

Dot-As	Positivo	Negativo	Total
Reagente	40	80	120
Não reagente	0	95	95
Total	40	175	215

Dot-At	Positivo	Negativo	Total
Reagente	46	74	120
Não reagente	5	90	95
Total	51	164	215

DISCUSSÃO

A necessidade de técnicas imunológicas que diagnostiquem com segurança e rapidez a doença de Chagas e que possam ser facilmente implantadas em bancos de sangue se torna premente, quando se analisa o aumento significativo das infecções transmitidas por transfusões sanguíneas (DIAS & BRENER, 1984).

A Organização Mundial de Saúde preocupada com este problema vem apoiando e estimulando pesquisas para o desenvolvimento de novas técnicas imunodiagnósticas. Neste contexto, efetuamos a avaliação da técnica de Dot-ELISA em paralelo com a de IFI, onde foram empregadas formas amastigotas do Trypanosoma cruzi obtidas de cultivo celular.

Na etapa anterior à avaliação propriamente dita das duas técnicas referidas correspondente à de padronização, o estabelecimento dos respectivos limiares de reatividade foram de primordial importância.

A padronização da técnica de IFI foi relativamente fácil por termos baseado nos testes convencionais, ao contrário da Dot-ELISA que exigiu entre outros fatores, a averiguação de diferentes tipos de antígenos.

Resultados satisfatórios puderam ser obtidos na técnica imunoenzimática com antígenos de amastigota e epimastigota solubilizados por hidrólise alcalina, aqui denominados respectivamente, de Dot-As e Dot-Es.

Antígeno de epimastigota assim preparado foi reportado como sendo estável por HOSHINO-SHIMIZU et alii (1978), para reação de hemaglutinação passiva. Igualmente LISSALDO (1988), ao testar este mesmo antígeno em Dot-ELISA verificou que o antígeno era estável e os resultados, superiores em relação aos demais extratos antigênicos estudados.

O tratamento dos antígenos por álcalis clivaria as moléculas em polipeptídeos menores, selecionando aqueles mais resistentes ao pH alcalino e com epitopos mais reativos para anticorpos anti-Trypanosoma cruzi. O antígeno, após breve centrifugação, não foi submetido a posterior purificação ou separação, portanto o extrato antigênico estudado é complexo.

Quanto aos antígenos lisados com detergentes aniônico SDS e não iônico NP-40, os resultados não foram como esperados, pois ambos forneceram padrões de coloração irregular, de difícil interpretação, embora a literatura cite estes detergentes como sendo bons agentes solubilizantes de diferentes antígenos.

Baixa sensibilidade foi obtida em Dot-ELISA quando os antígenos foram lisados com o detergente aniônico DOC, mesmo variando-se suas concentrações. Este detergente

conferiu aos antígenos uma viscosidade alta, tornando difícil a adsorção dos mesmos na membrana de nitrocelulose. Fato semelhante foi observado por SNARY et alii (1981), quando utilizaram DOC para remoção de proteínas inespecíficas, durante a purificação da glicoproteína de 72 kDa. A explicação dada por estes autores foi a de que DOC promoveria a degradação proteolítica e a liberação de DNA nuclear durante a solubilização que tornava o meio bastante viscoso.

O antígeno bruto aqui ensaiado sob a forma fragmentada por ultrasonicação na Dot-At forneceu resultados equivalentes aos da Dot-As. Desta forma, o antígeno As foi preferido baseando-se na sua estabilidade por um período de pelo menos 8 meses, como mencionaremos mais adiante. Assim ficou caracterizado que o antígeno As que é de preparo fácil, econômico e estável viria de encontro às necessidades dos países em desenvolvimento.

Os limiares de reatividade foram determinados para cada tipo de reação sorológica com seus respectivos antígenos, na detecção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA em diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com o intuito de obter a máxima discriminação entre chagásicos e não chagásicos, bem como entre as diferentes formas clínicas da doença.

Na pesquisa de anticorpos IgG (Figuras 2 e 14) em 215 amostras de soros de pacientes chagásicos e não chagásicos (Tabela I de Materiais e Métodos), os limiares para as técnicas de IFI e Dot-ELISA foram diferentes (Tabela 8), sendo de 20 e 80 para IFI-E e IFI-A, respectivamente, e de 160, tanto para Dot-As e Dot-At. Os limiares de reatividade estipulados para IFI-A e Dot-As forneceram 100% de eficiência relativa, discriminando indivíduos chagásicos e não chagásicos, desde que excluídos os casos de leishmaniose.

Quanto à reatividade de amastigota na IFI, expressa em termos de média geométrica dos títulos (Tabela II), foi 4 vezes superior a de epimastigota na mesma reação.

Estes dados indicam a maior reatividade das formas amastigotas, provavelmente, devido a epitopos de membrana ou epitopos crípticos durante a formolização dos parasitas. A evidência da maior reatividade dos antígenos de membrana da forma amastigota de cultivo foi previamente mostrada por ARAÚJO & REMINGTON (1981a) quando as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do Trypanosoma cruzi foram marcadas com iôdo radioativo e imunoprecipitadas com soros de pacientes chagásicos crônicos. A forte reatividade da forma amastigota com soros de pacientes chagásicos crônicos

foi atribuída à presença de uma glicoproteína de 70-84 kDa, também denominada de Ssp-4, por ANDREWS et alii (1989), tendo características semelhantes a de 83 kDa descrita por PAN et alii (1989). Desconhece-se entretanto se esta alta reatividade ocorreria com soros de pacientes com doença de Chagas na fase aguda.

De um modo geral, independentemente da procedência de amastigota, se "in vivo" ou "in vitro", as glicoproteínas acima referidas parecem conferir a alta reatividade como verificado por diferentes autores (CERISOLA et alii, 1971; COSSIO et alii, 1983, 1985; ARAÚJO & GUPTILL, 1984; e PRIMAVERA et alii, 1990).

Na detecção de anticorpos IgG empregando a técnica de Dot-At, Dot-As e Dot-Es, os dados em MGT foram bastante similares (aproximadamente de 2200), contudo quando comparados com os de IFI-E (Tabela II), eram 5,5 vezes superiores.

É interessante notar que na IFI onde apenas os antígenos de membrana são considerados, diferenças significativas de reatividade são verificadas entre epimastigota e amastigota. No entanto, esta diferença de reatividade entre as formas desaparece quando os extratos antigênicos destas formas são utilizados em Dot-ELISA.

A análise global das características diagnósticas das técnicas de IFI e Dot-ELISA revelou a inexistência de diferenças entre estas (Figuras 15, 3 e 4), se comparados os índices relativos pertinentes à sensibilidade, especificidade, eficiência, falsos positivo e negativo. Portanto para o diagnóstico da doença de Chagas, tanto as formas epimastigotas como amastigotas poderão ser empregadas, através da detecção de anticorpos IgG.

Mediante a análise estatística de variância dos níveis de anticorpos dos grupos estudados, a demonstração da existência de diferenças significativas entre pacientes chagásicos e não chagásicos foi possível, assim como entre chagásicos da fase aguda e crônica. Contudo, diferenças entre níveis de anticorpos nas diferentes formas crônicas da doença de Chagas não puderam ser verificadas.

Após estipulados os limiares de reatividade para cada uma das técnicas (IgG), a positividade encontrada em pacientes chagásicos foi praticamente de 100%, com exceção de Dot-At onde um soro de paciente com infecção chagásica aguda forneceu resultado completamente negativo. Reações cruzadas com leishmaniose visceral, de 62,5%, foram demonstradas nas técnicas de IFI-E, IFI-A, Dot-As, porém de

75% na Dot-At. As técnicas de IFI com antígeno E e A forneceram também reações cruzadas com casos de febre reumática, os quais não ocorreram em Dot-As e Dot-At. Estes achados falam em favor de Dot-As, embora o número de soros estudados seja estatisticamente pequeno.

Os nossos achados porém assemelham-se aos de DE HUBSCH et alii (1988, 1989), que utilizaram como antígeno suspensões formolizadas de epimastigotas e extrato citoplasmático de epimastigotas deslipidado, alcançando sensibilidade de 100% para ambos os antígenos e especificidade de 96% para o primeiro antígeno e de 100%, para o segundo, desde que os casos de leishmaniose visceral e cutânea fossem também excluídos. Os mesmos autores encontraram reações cruzadas com leishmaniose (visceral e cutânea) de aproximadamente 69%, de 9% em cardiopatias não chagásicas e de 7% em diversas afecções, com Dot-ELISA utilizando antígeno citoplasmático. Enquanto que na mesma técnica com o antígeno sob a forma de suspensão de epimastigota, a reatividade cruzada foi verificada em cerca de 69% de leishmaniose, em contraste com as outras afecções onde nenhuma reatividade foi observada. Estudos posteriores referente à avaliação soropidemiológica destes 2 antígenos vieram a confirmar os achados acima referidos.

Os tripanosomatídeos são filogeneticamente próximos possuindo moléculas imunologicamente semelhantes. Alguns autores (AFCHAIN et alii, 1979) calculam índices de homologia para antígenos solúveis de Trypanosoma cruzi com Trypanosoma rangeli de 60%, com Trypanosoma brucei de 40% e com Leishmania mexicana e donovani de 30%. Razão pela qual CAMARGO & HOSHINO-SHIMIZU (1974), quando compararam as técnicas de IFI e Hemaglutinação passiva, encontraram positividade de 41% em pacientes com leishmaniose tegumentar, embora esta positividade seja menor do que a daquela aqui observada.

Na detecção de anticorpos da classe IgM (Figuras 6, 7 e 8), os limiares de reatividade encontrados para IFI-A e IFI-E foram 160 e 40, respectivamente; ao passo que para Dot-As e Dot-At, 40 e 80, respectivamente.

A reatividade apresentada por amastigotas na técnica de IFI foi 2 vezes maior do que a das formas epimastigotas (Tabela II), analogamente à detecção de anticorpos IgG.

A avaliação realizada em 4 técnicas aqui estudadas indicou que a sensibilidade e a especificidade são semelhantes para o diagnóstico da forma aguda da doença de Chagas, desde que as formas crônicas fossem excluídas para a análise. Assim, os anticorpos IgM foram detectados em todos os pacientes com infecção chagásica aguda, nas técnicas sorológicas em estudo, com exceção da Dot-At (90%). Nos casos crônicos da doença de Chagas, estes anticorpos foram

detectados principalmente pelas técnicas de IFI, porém em número muito reduzido nas de Dot-As e Dot-At. Estes anticorpos são considerados marcadores imunológicos da doença de Chagas, e foram relevados inicialmente por MUNIZ (1947), e a seguir por PELLEGRINO (1956), sendo confirmados por CAMARGO & LESER (1974) e HOSHINO-SHIMIZU et alii (1978).

Possíveis fatores interferentes na detecção de IgM, como por exemplo fator reumatóide, foram removidos pela absorção dos soros com gama globulina agregada (CAMARGO et alii, 1972). Portanto os nossos resultados positivos observados em formas crônicas da doença de Chagas sugerem que os pacientes poderiam estar no início da fase crônica, o que explicaria os títulos baixos de anticorpos IgM detectados. Por outro lado, é também possível que, na fase crônica, anticorpos IgM estejam presentes em alguns casos.

Os anticorpos IgM foram também encontrados na leishmaniose visceral, somente nas técnicas de Dot-As e Dot-At. Provavelmente, esta reação cruzada pode ou não decorrer dos referidos anticorpos anti-galactosil (alfa 1-3) manose encontrados tanto na doença de Chagas como nas leishmanioses (ÁVILA et alii, 1990).

Para o diagnóstico de infecção chagásica aguda, o emprego de antígenos polissacarídicos das formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi é conhecido desde 1947 (MUNIZ), que foi em 1956 confirmado por PELLEGRINO et alii, na reação de precipitação "in vitro". Além disso, HOSHINO-SHIMIZU et alii (1978) verificaram que componentes

polissacarídicos de epimastigotas do Trypanosoma cruzi (solubilizados por hidrólise alcalina) poderiam ser naturalmente selecionados em condições especiais durante o processo de sensibilização de hemácias, destinados para a detecção de anticorpos IgM encontrados nas formas agudas da doença de Chagas. Esta observação sugere que componentes antigênicos da membrana, principalmente de natureza polissacarídica, possivelmente tendo os referidos epitopos de resíduos de galactosil (alfa 1-3) manose (ÁVILA et alii, 1990) possam estar implicados na reação com os anticorpos da classe IgM e que se encontram presentes no extrato antigênico alcalino (As).

A ausência de reação cruzada nas técnicas de IFI com epimastigotas e amastigotas com anticorpos IgM de leishmaniose visceral poderia ser explicada pela perda, na competição, destes anticorpos frente os IgG igualmente presentes no soro em concentrações maiores. Talvez com a absorção dos anticorpos IgG, os IgM poderiam ser revelados, à semelhança do que ocorre na toxoplasmose aguda (YAMAMOTO, 1987).

A análise estatística de variância dos níveis de anticorpos IgM demonstrou que existe diferenças significativas entre indivíduos chagásicos de fase aguda e fase crônica, bem como dos não chagásicos.

A literatura sobre a detecção de anticorpos da classe IgA, na infecção chagásica, é muito pobre. No entanto, em outras parasitoses a sua presença está geralmente associada com a fase inicial da doença (KANAMURA et alii, 1979; SHAW & LAINSON, 1981; TURUNEN et alii, 1983; e PRIMAVERA et alii, 1990).

Os nossos achados quanto aos anticorpos IgA confirmam os achados desses autores, pois na fase aguda, seus títulos foram mais elevados nas técnicas de IFI-E, IFI-A e Dot-At. Por estas mesmas técnicas, uma pequena porcentagem de indivíduos normais, assim como alguns pacientes com febre reumática e sífilis reagiram em baixos títulos. Mais uma vez, estes resultados sugerem a existência de reação cruzada entre componentes da superfície do parasita e de outros agentes infectantes. Este aspecto constituirá assunto de nossas investigações futuras.

Nas formas crônicas digestivas de pacientes chagásicos, SÁ-FERREIRA et alii (1983) encontraram imunoglobulinas A em níveis mais elevados pela técnica de imunodifusão radial de Mancini, contudo correlação entre anticorpos IgA, anti-epimastigota, e estes níveis de imunoglobulinas A totais não pôde ser verificada.

Recentemente, PRIMAVERA et alii (1990), estudando comparativamente os antígenos das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota na técnica de IFI-IgA, observaram baixa eficiência dos antígenos de epimastigota e

tripomastigota. Amastigotas, no entanto, forneceram resultados surpreendentes, demonstrando a existência de correlação positiva entre anticorpos IgA e forma crônica digestiva da doença de Chagas.

Os nossos resultados mostram a inexistência desta correlação, que poderia ser atribuída ao fato de que os amastigotas de cultivo possam ser antigenicamente diferentes das amastigotas obtidas de animais infectados. Todavia, devemos levar em consideração que o grupo de pacientes aqui estudado e classificado clinicamente como sendo chagásico crônico com forma digestiva, por não ter sido avaliado radiologicamente, mas apenas baseado em sintomas de distúrbios digestivos, os resultados obtidos não poderiam ser comparados.

Os anticorpos da classe IgA apresentaram também baixa eficiência diagnóstica, quando submetidos à análise de variância (Figura 18).

Durante a fase de padronização para detecção de anticorpos IgA em Dot-ELISA, cuidados foram tomados para que eventuais imunoglobulinas A do leite, empregado como bloqueador dos sítios ativos na membrana de nitrocelulose, pudessem interferir na reação. Contudo, a tal interferência não foi observada, e portanto, o leite que é um produto econômico foi empregado durante todo o período do presente trabalho.

A análise de correlação entre os níveis de anticorpos obtidos, nas diferentes técnicas aqui estudadas, permite o controle de uma técnica em relação à outra. Desta forma, na detecção de anticorpos IgG (Figura 19), alta correlação positiva foi encontrada entre IFI-A e IFI-E, seguida de Dot-As e IFI-A; embora nas outras associações de técnicas, as correlações fossem também altas, cujos índices não sendo inferiores a 0,8456.

Para a detecção de anticorpos IgM, alta correlação foi obtida entre IFI-A e IFI-E; enquanto que para os anticorpos IgA, Dot-At e Dot-As (Figuras 20 e 21).

Levando-se em consideração o fato de que a maioria dos laboratórios para o sorodiagnóstico da infecção chagásica apoia nos resultados de pelo menos duas técnicas sorológicas, as retas de regressão poderão prestar auxílio inestimável para o controle e fiscalização de uma técnica mediante a observação de títulos fornecidos por uma outra.

A reprodutibilidade dos testes de Dot-ELISA é referida por vários autores, porém não apresentam dados concretos como no presente trabalho, onde ensaios inter e intra-testes foram realizados.

Ademais, nas nossas condições de trabalho, a estabilidade do antígeno As em membrana de nitrocelulose foi de pelo menos 8 meses a 4 °C, sem perda da sua reatividade. Esta estabilidade é compatível com a de outros autores, porém a determinação exata da vida média deste antígeno

necessita ser melhor averiguada. O antígeno At, no entanto, apresentou pouca estabilidade, provavelmente devido ao tamanho das partículas. Estudos posteriores, com partículas menores do que aquelas aqui estudadas, possam talvez resultar em antígenos com maior estabilidade.

Os antígenos de imunofluorescência são em geral pouco estáveis a 4 °C, e portanto, são conservados a -20 °C por um período de até 3 meses, ou de 3 anos, quando conservados a -70 °C.

Foi realizado ainda um estudo preliminar de caracterização dos componentes das formas epimastigotas e amastigotas, na tentativa de verificar diferenças no padrão de reatividade frente a anticorpos IgG e IgM, das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Os anticorpos da classe G mostrou reconhecimento complexo de proteínas de diferentes pesos moleculares (Figuras 24 A, A', B, e B'), independentemente das formas do parasita. Provavelmente, um estudo ao nível de subgrupos de IgG poderia trazer maiores informações, quanto à diferença entre os antígenos aqui estudados. Além disso se identificarmos as frações polissacarídicas mediante o uso de reveladores, como por exemplo de lectinas, contribuiria também para evidênciação das possíveis diferenças.

Os anticorpos IgM por sua vez reconheceram reduzido número de bandas em relação aos IgG. Nos antígenos de amastigota, em geral, o número de bandas reconhecidas foi ligeiramente maior do que o de epimastigotas.

Estes dados preliminares terão de ser melhor confirmados, a par de estudos de antígenos sob sua forma nativa para melhor correlacionamento entre os resultados de "immunoblotting" e Dot-ELISA.

Em geral no estudo da avaliação de uma técnica ou de um antígeno, fatores pertinentes ao desempenho diagnóstico, tais como: sensibilidade, especificidade, e outros, além de reações cruzadas, reprodutibilidade e estabilidade devem ser analisados, a fim de que os dados obtidos por diferentes autores possam ser melhor comparados, facilitando conseqüentemente a escolha da técnica mais apropriada para finalidades diagnósticas individuais ou populacionais.

A análise global dos nossos resultados indicam que tanto a IFI-A como Dot-As se prestam para o diagnóstico da doença de Chagas, por demonstrar estreito paralelismo com os dados de IFI-E, que foi tomado como referência.

Sem dúvida, o aspecto das reações cruzadas merece maior estudo, para confirmar a especificidade aqui obtida.

Nos grandes laboratórios onde normalmente se executa a IFI-E, formas amastigotas de cultivo celular são possíveis de serem introduzidas como antígeno alternativo às formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi, em vista da sua alta reatividade.

Dot-As demonstrou preencher a maioria das características esperadas de uma técnica de boa qualidade, sendo o prazo para obtenção de resultados comparável ao da imunofluorescência convencional, desde que a membrana já bloqueada seja conservada com o antígeno, conforme aqui padronizado. Esta técnica apresenta vantagem, a seu favor, por não necessitar de nenhum equipamento, nem pessoal especializado, pois a leitura das reações é muito fácil, devido à nítida diferença entre aquelas positivas (coloração violácea), e as negativas (ausência completa de coloração).

Portanto, parece-nos que esta técnica teria utilidade na triagem de infecção chagásica em bancos de sangue, bem como no diagnóstico de rotina em centros de poucos recursos.

CONCLUSÕES

1 - A padronização e avaliação das técnicas de IFI e Dot-ELISA, utilizando antígenos da forma amastigota do Trypanosoma cruzi, possibilitaram as seguintes observações:

- Presença de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi em todas as formas clínicas da doença de Chagas, com altos índices de sensibilidade, especificidade e eficiência;

- Predominância de anticorpos IgM anti-Trypanosoma cruzi na fase aguda da doença de Chagas, assim como a presença de anticorpos IgA anti-Trypanosoma cruzi em alguns pacientes nesta mesma forma clínica.

2 - A avaliação das técnicas de IFI e Dot-ELISA, utilizando antígenos, tanto de formas amastigotas como de epimastigotas para finalidades diagnósticas, apresentou como principais aspectos:

- Altos índices relativos de sensibilidade, especificidade e eficiência para IFI e Dot-ELISA com antígenos da forma amastigota, quando comparados aos de IFI com a forma epimastigota;

- Semelhança no desempenho diagnóstico e na reatividade antigênica de Dot-As e Dot-Es, na detecção de anticorpos IgG anti-Trypanosoma cruzi;
 - Alto grau de reatividade antigênica da forma amastigota em relação à forma epimastigota na IFI;
 - Correlação positiva entre títulos de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-Trypanosoma cruzi;
 - As vantagens quanto aos aspectos de praticidade, reprodutibilidade e estabilidade, recomendam a utilização de Dot-As para triagem de chagásicos, mesmo em laboratório de poucos recursos.
- 3 - A caracterização preliminar dos antígenos utilizados nas técnicas permitiram as seguintes verificações:
- Reconhecimento de numerosos polipeptídeos tanto com antígenos totais, como solúveis das formas epimastigotas e amastigotas por soros de pacientes chagásicos crônicos, e em menor complexidade com soros de pacientes com infecção chagásica aguda.

- Diferenças de reconhecimento existente entre os antígenos solúveis das formas epimastigota e amastigota, apesar de ambos terem demonstrado comportamento similar na Dot-ELISA.

RESUMO

As formas do Trypanosoma cruzi obtidas do sobrenadante de cultivo de células LLC-MK₂ foram investigadas como antígenos nas técnicas de IFI e Dot-ELISA, para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA, no diagnóstico da doença de Chagas. Um total de 223 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, incluindo leishmaniose e outras afecções foi ensaiado na técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de amastigota (IFI-A) e na de imunoenzimática com antígeno de amastigota solubilizado em meio alcalino (Dot-As), bem como com o antígeno de amastigota fragmentado por ultra-som (Dot-At), em comparação com técnicas de referência, onde formas epimastigotas são utilizadas (IFI-E e Dot-Es). Anticorpos da classe IgG foram detectados em todas as formas clínicas da doença de Chagas (aguda e crônica indeterminada, cardíaca e digestiva). Anticorpos IgM foram encontrados predominantemente nas formas agudas, assim como os anticorpos IgA. Como esperado, reações cruzadas foram verificadas com leishmaniose visceral. O desempenho diagnóstico das técnicas de IFI-A, Dot-As e Dot- At não diferiram significativamente das técnicas de referência. A reatividade das formas amastigotas foi de 2 a 4 vezes maior nas técnicas de IFI em relação à epimastigota convencional, enquanto que nas técnicas imunoenzimáticas, as diferenças não foram

significativas entre estes dois antígenos. Na caracterização preliminar dos antígenos aqui estudados, os soros de pacientes chagásicos crônicos (IgG) mostraram reconhecimento complexo de polipeptídeos tanto nas formas amastigotas como epimastigotas, contrastando com os soros de chagásicos da fase aguda, que teve reconhecimento menos complexo. Considerando-se os aspectos de praticidade, reprodutibilidade e estabilidade, a técnica de Dot-As ressalta como sendo satisfatória para triagem de chagásicos, mesmo em laboratórios de pequenos recursos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFCHAIN, D.; FRUIT, J.; YARZABAL, L.; CAPRON, A. Purification of a specific antigen of Trypanosoma cruzi from culture forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 478-82, 1978.
- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of Trypanosoma cruzi culture forms: identification of a specific component. *J. Parasitol.*, 65: 507-14, 1979.
- AMATO NETO, V.; TAKEI, K.; SILVA, L.J.; MELO, E. Análise da sensibilidade de nova prova sorológica de floculação para o diagnóstico da doença de Chagas. *Rev. Bras. Clín. Terap.*, 5: 413-6, 1976.
- AMORIM, D.S.; MANÇO, J.C.; GALLO JR, L.; MARIN NETO, J.A. Clínica: Forma crônica cardíaca. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1979. p. 265-311.
- ANDERTON, B.H. & THORPE, R.C. New methods of analysing for antigens and glycoproteins in complex mixtures. *Immunol. Today*, 1: 122-7, 1980.
- ANDREWS, N.W.; EINSTEIN, M.; NUSSENZWEIG, V. Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi amastigotes in sera from chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40: 46-9, 1989.
- ARAÚJO, F.G. A method for demonstration of antibodies to Trypanosoma cruzi by using antigen-coated nitrocellulose papers strips. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 242-5, 1985.

- ARAÚJO, F.G. & REMINGTON, J.S. Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components. *J. Immunol.*, 127: 855-9, 1981a.
- ARAÚJO, F.G. & GUPTILL, D. Use of antigen preparations of the amastigote stage of Trypanosoma cruzi in the serology of Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 362-71, 1984.
- ARAÚJO, F.G.; CHIARI, E.; DIAS, J.P.C. Demonstration of Trypanosoma cruzi in serum from patients with Chagas'disease. *The Lancet*, 1: 246-9, 1981b.
- AVILA, J.L. & ROJAS, M. A galactosyl (alfa 1-3) mannose epitope on phospholipids of Leishmania mexicana and L. brasiliensis is recognized by trypanosomatid-infected human sera. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1530-7, 1990.
- BARUFFA, G. & ALCANTARA FILHO, A. Comparação entre fixação do complemento em placa, a hemaglutinação e a prova de aglutinação com látex no diagnóstico da doença de Chagas na zona sul do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 9: 121-7, 1975.
- BATISTA, S.M. & SANTOS, U.M. Antígeno metílico de cultura de "Schizotrypanum cruzi". *Hospital*, 56: 1045-51, 1959.
- BEAUTIN, L.; BODE, L.; RICHTER, T.; PELTRE, G.; STEPHAN, R. Rapid visual detection of Escherichia coli and Vibrio cholerae heat-labile enterotoxins by nitrocellulose enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microb.*, 19: 371-5, 1984.
- BENNETT, F.C. & YEOMAN, L.C. An improved procedure for the 'Dot Immunobinding' analysis of hybridoma supernatants. *J. Immunol. Methods*, 61: 201-7, 1983.

- BOCTOR, F.N.; STEK JR, M.J.; PETER, J.B.; KAMAL, R. Simplification and standardization of Dot-ELISA for human schistosomiasis mansoni. *J. Parasit.*, 73: 589-92, 1987.
- BRENER, Z. Immunity to Trypanosoma cruzi. *Adv. Parasitol.*, 18: 247-292, 1980.
- BURNETTE, W.M. Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to in modified nitrocelulose and radiographic detection with antibody and radioidenated protein A. *Anal. Biochem.*, 112: 195-203, 1981.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6: 93-100, 1964.
- CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 8: 227-34, 1966.
- CAMARGO, M.E. Reacciones serologicas y consecuencias sociales de los resultados positivos a la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 72: 576-82, 1972
- CAMARGO, M.E. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Ars. Curandi Cardiologia*, 9: 29-38, 1987.
- CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. Cross reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibiton procedure to ensure specific results. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 18: 500-5, 1969.

- CAMARGO, M.E. & AMATO NETO, V. Anti-Trypanosoma cruzi IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 16: 200-2, 1974.
- CAMARGO, M.E. & HOSHINO-SHIMIZU, S. Metodologia sorológica na infecção pelo Trypanosoma cruzi. *Rev. Goiana Med.*, 20: 47-65, 1974.
- CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. Diagnóstico acidental de laboratório de infecções chagásicas agudas pós-transfusionais não suspeitadas. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, 20: 335-6, 1974.
- CAMARGO, M.E. & TAKEDA, G.K.F. Diagnóstico de laboratório. In: BRENER, Z & ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1979. p.175-98.
- CAMARGO, M.E.; LESER, P.G.; ROCCA, A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-toxoplasma fluorescent test. A technique for specific results. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14: 310-3, 1972.
- CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; UMEZAWA, E.S. Rapid agglutination test for American trypanosomiasis with sensitized and preserved human blood erythrocytes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PARASITOLOGIA, 3º, Medellin, Colombia, 1973.
- CAMARGO, M.E.; BATISTA, S.M.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Avaliação de reagente liofilizado de hemaglutinação para diagnóstico de Tripanosomíase Americana. Estudo em 1.123 amostras de soros de doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 17: 350-4, 1975a.

- CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; UMEZAWA, E.S. Further evaluation of the "IMT-Chagas flocculation test". A comparison with complement fixation, hemagglutination and immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 17: 230-235, 1975b.
- CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MACEDO, V.; PERES, B.A.; CASTRO, C. Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo Trypanosoma cruzi. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação em 3.624 soros. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 19: 254-260, 1977.
- CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W.; MINEO, J.R.; CARRARO, F.M.; BRODSKYN, C.I. A practical immunoenzymatic test for routine serologic diagnosis of Chagas' disease. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. *Anais*. p. 218.
- CASTRO, C.; REZENDE, J.M. DE; CAMARGO, M.; CERISOLA, J.A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Esofagopatia chagásica no município de Mambai. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 17 (Supl): 22, 1984.
- CERISOLA, J.A. Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunofluorescence tests. *J. Parasit.*, 56: 409-10, 1970.
- CERISOLA, J.A. Chemotherapy of Chagas' infection in man. In: *Chagas' disease*. PAHO Scientific Publication n° 347, p.35-47, 1977.
- CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; DE RISSIO, A.M. Imunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução sorológica de pacientes com a doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12: 403-11, 1970.

- CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; BOCK, M.; WEGNER, D. A comparison of a new antigen from amastigotes of Trypanosoma cruzi and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas'disease by the indirect immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 13: 162-6, 1971.
- CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; MARTINI, G.J.W. Reacción de aglutinación de particulos de latex para el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 40 (Suppl. 1):132-6, 1980.
- CHOCAIR, P.R.; SABBAGA, E.; AMATO NETO, V.; SHIROMA, M.; GOÉS, G.M. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 23: 280-2, 1981.
- CLARKSON, A.B.JR. & MELLOW, G.H. Rheumatoid factors and Chagas'disease. *Science*, 219: 1238-9, 1983.
- COSSIO, P.M.; CASANOVA, M.B.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; FERNANDEZ, L.; ARANA, R.M. El posible uso de amastigotes tisulares de T.cruzi para pruebas serologicas de inmunofluorescencia. *Medicina (Buenos Aires)*, 43: 737-8, 1983.
- COSSIO, P.M.; CASANOVA, M.B.; MARIANI, A.L.; GONZALEZ-CAPPA, S.; FERNANDEZ, L.; ARANA, R.B. Criostat sections with tissue amastigotes of Trypanosoma cruzi as a substrat for Chagas'disease serology. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 805-7, 1985.
- COURA, J.R. & PEREIRA, J.B. A follow-up evaluation of Chagas'disease in two endemic areas in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (Suppl.): 107-12, 1984.

- COURA, J.R.; ABREU, L.L.; DUBOIS, L.G.; CORREIA LIMA, F.G.; WILLCOX, H.P.F.; FIGUEIREDO, P.Z. Estudo seccional sobre a doença de Chagas em 3 diferentes áreas endêmicas no Brasil In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. Anais. p.41.
- DE HUBSCH, R.M.; CHIECHIE, N.; COMACH, G.; ALDAO, R.R.; GUSMAO, R.D'A. El ensayo inmunoenzimatico en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigenicas de Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83: 277-85, 1988.
- DE HUBSCH, R.M.; CHIECHIE, N.; COMACH, G.; ALDAO, R.R.; GUSMAO, R.D'A. El ensayo inmunoenzimatico en microgotas (Dot-ELISA) en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. II. Estudio seroepidemiologico em cuatro comunidades rurales de Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84: 401-8, 1989.
- DIAS, J.C.P. Control of Chagas'disease in Brazil. Parasitol Today, 3: 336-41, 1987.
- DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas'disease. A clinical epidemiological review. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 22: 147-56, 1989.
- DIAS, J.C.P. & BRENER, S. Chagas'disease and blood transfusion. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 79 (Supl.): 139-47, 1984.
- DRAGON, E.A.; BROTHERS, V.M.; WRIGHTSMAN, R.A.; MANNING, J. A Mr 90.000 surface polypeptide of Trypanosoma cruzi as a candidate for a Chagas'disease diagnostic antigen. Mol. Biochem. Parasitol., 16: 213-29, 1985.

- ENDERS, B.; HUNGERER, K.D.; ZWIESLER, O. Survey on experiences with Latex Chagas Test in various countries. *Z. Tropenmed, Parasit.*, 26: 252-60, 1975.
- FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.*, 18: 195-202, 1966.
- FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E.; NAKAHARA, O.S. T.cruzi: Immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. *Exp. Parasit.*, 37: 131-7, 1975.
- FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E.; NAKAHARA, O.S.; CALDINI, A.L.M.; PRATA, A. Teste imunoenzimático (ELISA) para infecção chagásica. Estudo comparativo com outros testes sorológicos em 205 residentes de região endêmica (Mambá - Go). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 13^o, Brasília, 1977. Anais. p. 53.
- FIFE, E.H. & MUSHEL, L.H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of Trypanosoma cruzi infection. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 101: 540-3, 1959.
- FISTEN, B. & CHOWDHURY, M.N.HY. Trypanosoma cruzi. A suggested adjunct to xenodiagnosis. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 74: 251-3, 1980.
- FLINT, J.E.; SCHECHTER, M.; CHAPMAN, M.D.; MILES, M.A. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against Trypanosoma cruzi. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78: 193-202, 1984.
- FREILIJ, H.L.; CORRAL, R.S.; KATZIN, A.M.; GRINSTEIN, S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas'disease. *J. Clin. Microb.*, 25 (1): 133-7, 1987.
- GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York, John Willey & Sons, Inc., 1975, 237 p.

- GAM, A.A. & NEVA, F.A. Comparison of cell culture with epimastigote antigens of Trypanosoma cruzi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26: 47-57, 1977.
- GELLER, M.; GUELLER, M.; FLAHERTY, D.K.; BLACK, P.; CAPENEMA-SOUZA, A.P. Serum IgE levels in Chagas'disease. *Clin. Allergy*, 2: 383-5, 1978.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil-méd.*, 27: 225-6, 1913.
- GUIMARÃES, M.C.S.; CELESTE, B.J.; FRANCO, E.L. Evaluation of Dot enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. *J. Clin. Microb.*, 24: 364-7, 1986.
- HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, 119: 142-7, 1982.
- HAYES, R.J. & SCHOFIELD, C.J. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 108: 308-16, 1990.
- HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; UMEZAWA, E.S. A rapid slide flocculation test for the diagnosis of American trypanosomiasis using Trypanosoma cruzi fragments preserved by lyophilization. Comparison with hemagglutination, immunofluorescence and complement fixation tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24: 586-9, 1975.
- HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; NAGASSE, T.K. A stable polysaccharide hemagglutination reagent for the diagnosis acute or recent Trypanosoma cruzi infections. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 20: 208-12, 1978.

- HOSHINO-SHIMIZU, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; CASTILHO, E.A.; CAMARGO, M.E.; SHIMIZU, T. Diagrama de verificación para evaluar reactivos de hemaglutinación usados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 101: 465-76, 1986.
- ISRAELSKI, D.M.; SADLER, R.; ARAÚJO, F.G. Antibody response and antigen recognition in human infection with Trypanosoma cruzi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39: 445-55, 1988.
- JAFFE, C.L. & ZALIS, M. Use of purified parasite proteins from Leishmania donovani for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 157: 1212-20, 1988.
- KAFATOS, F.C.; JONES, C.W.; EFSTRADIADIS, F.C. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a Dot-hybridization procedure. *Nucl. Acids. Res.*, 7: 1541-52, 1979.
- KANAMURA, H.Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; SILVA, L.C. Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 242-8, 1979.
- KNIERIM, F. & RUBINSTEIN, P. The detection of Chagas' disease. A rapid hemagglutination test for special use in blood banks and in epidemiological studies. *Vox Sang. (Basel)*, 18: 280-6, 1970.
- KNIERIM, F.; ESKUCHE, G.; SANDOVAL, L.; MUÑOZ, E. Reacción de aglutinación con látex para el diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasit.*, 26: 32-5, 1971.

- KRETTLI, A.U. Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and human infections. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.*, 3: 327-45, 1982.
- KRETTLI, A.U. Resposta imune humoral na doença de Chagas. *Interciencia*, 8: 374-83, 1983.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-5, 1970.
- LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14: 1035-60, 1956.
- LELCHUK, R.; DALMASSO, A.P.; INGLESINI, C.L.; ALVAREZ, M.; CERISOLA, J.A. Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, 6: 547-55, 1970.
- LEVIN, J. Análise de variância. In: *Estatística aplicada a Ciências Humanas*. 2^a ed. São Paulo, Ed. Harbra Ltda, 1987. p. 174-90.
- LISSALDO, A.M. Padronização da técnica de "Imunodot" para a detecção de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi e caracterização do extrato antigênico utilizado. São Paulo, 1988, 121 p. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- LONDNER, M.V.; ROSEN, G.; SINTOV, A.; SPIRA, D.T. The feasibility of a Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of Plasmodium falciparum antigens and antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 240-5, 1987.
- LOWRY, H.L.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75, 1951.

- LUTZ, W. Statistical methods as applied to immunological data. In: WEIR, D.M. *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967. appendix 1. p. 1163-1202.
- MACEDO, V.O. Forma indeterminada da doença de Chagas. *J. Bras. Med.*, 38: 34-40, 1980.
- MARCIPAR, A.; BARNES, S.; LENTWOJT, E.; BROWN, G. Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of Trypanosoma cruzi. *Appl. Biochem. Biotech.*, 7: 459-63, 1982.
- MONCAYO-MEDINA, A. Chagas' disease. In: MAURICE, J. & PEARCE, A.M., Ed. *Tropical Disease Research: A global partnership*. Geneva, WHO, 1987.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. I - Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41: 303-33, 1944.
- MUNIZ, J. Do valor da reação de precipitina do diagnóstico das formas agudas e sub-agudas da "doença de Chagas". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 45: 537-49, 1947.
- NAKANE, P.K. & KAWAOI, A. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084-91, 1974.
- NEAL, R.A. & MILES, R.A. Indirect haemagglutination test for Chagas' disease with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12: 325-32, 1970.
- NEVA, F.A. & GAM, A.A. A complement-fixing antigen from Trypanosoma cruzi grown in cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26: 37-46, 1977.
-

- OROZCO, O.; AFCHAIN, D.; DISSONS, C.; RODRIGUEZ, C.; OVLAQUE, G.; LEMESRE, J.L.; LOYENS, M.; CAPRON, A. Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for Trypanosoma cruzi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 560-8, 1984.
- PACKCHANIAN, A. Agglutination and precipitation tests for diagnosis of Trypanosoma cruzi infections (Chagas'disease). *J. Immunol.*, 29: 84-5, 1935.
- PAN, A.A. & MCMAHON-PRATT, D. Amastigote and epimastigote stage-specific components of Trypanosoma cruzi characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. *J. Immunol.*, 143: 1001-8, 1989.
- PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): A micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods*, 64: 205-14, 1983.
- PELLEGRINO, J. La malathia di Chagas. *Gazz. Int. Med. Chir.*, 59: 519-88, 1954.
- PELLEGRINO, J.; BRENER, Z.; JACOMO, R. A reação de precipitina na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Brasil. Malariol.*, 8: 247-52, 1956.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Comparison of the latex slide test agglutination and complement fixation test for the diagnosis of Chagas'disease. *J. Parasit.*, 57: 771, 1971.
- PRATA, A.; MAYRINK, W.; SODRÉ, A.G.; ALMEIDA, J.O. Discrepâncias relativas entre resultados de reações de Guerreiro e Machado executadas em 3 diferentes laboratórios. *Rev. Patol. Trop.*, 4: 35-8, 1975.

- PRATA, A. & MACEDO, V. Morbidity of Chagas' heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (Suppl.): 93-6, 1984.
- PRIMAVERA, K.S.C.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; UMEZAWA, E.S.; PERES, B.A.; MANIGOT, D.A.; CAMARGO, M.E. Immunoglobulin A antibodies to Trypanosoma cruzi antigens in digestive forms of Chagas' disease. *J. Clin. Microb.*, 26: 2101-4, 1988.
- PRIMAVERA, K.S.C.; UMEZAWA, E.S.; PERES, B.A.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to T.cruzi amastigote, tripomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 32: 172-80, 1990.
- RASSI, A. Clínica, Fase Aguda. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1979. p. 249-64.
- REZENDE, J.M. Manifestações digestivas. In: BRENER, Z & ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1979. p.312-61.
- REZENDE, J.M. The digestive tract in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (Suppl.): 97-106, 1984.
- ROMAÑA, C. Aplicación del método de Hemaglutinación al diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 37: 73-6, 1961.
- SÁ-FERREIRA, J.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; MACEDO, W.; CASTRO, C. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. *Clin. Exp. Immunol.*, 52: 266-70, 1983.
-

- SALGADO, A. de A.; MAYRINK, W.; DIAS, J.C.P. Estudo comparativo entre a reação de fixação do complemento com os antígenos benzeno-chloroformado e metílico e o xenodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12: 36-40, 1970.
- SCHARFSTEIN, J.; RODRIGUES, M.M.; ALVES, C.A.; DE SOUZA, V.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Trypanosoma cruzi: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J. Immunol.*, 131: 972-6, 1983.
- SCHARFSTEIN, J.; LUQUETTI, A.; MURTA, A.C.M.; SENNA, M.; REZENDE, J.M.; RASSI, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Chagas'disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 1153-60, 1985.
- SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MILES, M.A. Trypanosoma cruzi: characterization and isolation of a 57/51.000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, 137: 1336-41, 1986.
- SCHECHTER, M.; LUQUETTI, A.O.; REZENDE, J.M.; RASSI, A. MILES, M.A. Further evaluation of lectin affinity purified glycoprotein (GP90) in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of Trypanosoma cruzi infection. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 637-40, 1985.
- SCHMUNIS, G.A.; SZARFMAN, A.; COARASA, L.; VAINSTOK, C. Immunoglobulin concentration in treated human acute Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 473-77, 1978.
- SCOTT, M.T.; BAHR, G.; MODDABER, F.; AFCHAIN, D.; CHEDID, L. Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a Trypanosoma cruzi 90 K cell surface glycoprotein. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 74: 3737, 1984.

- SEIDLIN, M.; TAKIFF, H.E.; SMITH, H.A.; HAY, J.; STRANS, S.E. Detection of varicella-zoster virus by Dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. *J. Med. Virology*, 13: 53-61, 1984.
- SHAHEEN, H.I.; KAMAL, K.A.; FARID, Z.; MANSOUR, N.; BOCTOR, F.N.; WOODY, J.N. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of human fascioliasis. *J. Parasitol.*, 75: 549-52, 1989.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R. Leishmaniosis in Brazil. XIV. Leishmanial and trypanosomal IgA antibody in patients with leishmaniasis and Chagas' disease. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 254-7, 1981.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; LOPES, M.H.; TOLEZANO, J.E.; UMEZAWA, E.; AMATO NETO, V.; PEREIRA BARRETO, A.C.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A.A.B.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A.A.; DUARTE, A.; ODONE, V.; CERRI, G.C.; SATO, M.; POSSI, D.; SHIROMA, M. Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 32: 16-27, 1990.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENSWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20: 191-207, 1953.
- SIQUEIRA, A.F. Comparação de antígenos de Trypanosoma cruzi para reações quantitativas de fixação de complemento. I - Linearidade entre complexo imune e complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6: 101-10, 1964.
- SNARY, D.; FERGUSON, M.A.J.; SCOTT, M.T.; ALLEN, A.K. Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasit.*, 3: 343-56, 1981.

- STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.*, 79: 237-48, 1973.
- SZARFMAN, A.; OTATTI, L.; SCHMUNIS, G.A.; VILCHES, A.M. A simple method for the detection of human congenital Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 59: 723, 1973.
- TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350-4, 1979.
- TURUNEN, H.; VUORIO, K.S.; LEINIKKI, P.O. Determination of IgG, M, A. Antibody responses in human toxoplasmosis by ELISA. *Scand. J. Infect. Dis.*, 15: 307-311, 1983.
- UMEZAWA, E.S.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Growth of Trypanosoma cruzi by successive passage in tissue culture. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 11^o, Rio de Janeiro, 1975.
- UMEZAWA, E.S.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E. Antígenos de Trypanosoma cruzi: comparação das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas na reação da imunofluorescência indireta para o diagnóstico da doença de Chagas. In: REUNIÃO EM PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 7^a, Caxambu, MG, 1980. *Anais*. I₂₉.
- VATTUONE, N.H. & YANOVSKY, J.F. Trypanosoma cruzi: Agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. *Exp. Parasit.*, 30: 349-55, 1971.
- VATTUONE, N.H.; SZARFMAN, A.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas' disease). *J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 45-7, 1973.

WHITE, C. Statistical methods in serum survey. In: PAUL, J.R. & WHITE, C. *Serological epidemiology*. New York, Academic Press, 1973, p. 19-32.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Parasitic antigens. *Bull. WHO*, 52: 237-49, 1975.

VOLLER, A. Immunofluorescent observation on Trypanosoma cruzi. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 57: 232, 1963.

VOLLER, A.; DRAPPER, C.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas'disease. *Lancet*, 1: 426-8, 1975.

VOLLER, A & DE SAVIGNY, D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *J. Immunol. Methods*, 46: 1-29, 1981.

YAMAMOTO, Y.I. Toxoplasmose aguda: desenvolvimento do reagente de hemaglutinação passiva (HA-TOXO-IgM) para fins de diagnóstico. São Paulo, 1987, 126 p. [Dissertação de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

ZHENG, G.Y.; ZHAO, R.L.; FENG, X.H. Dot-immunobinding assay in the serodiagnosis of human hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35: 812-4, 1986.