

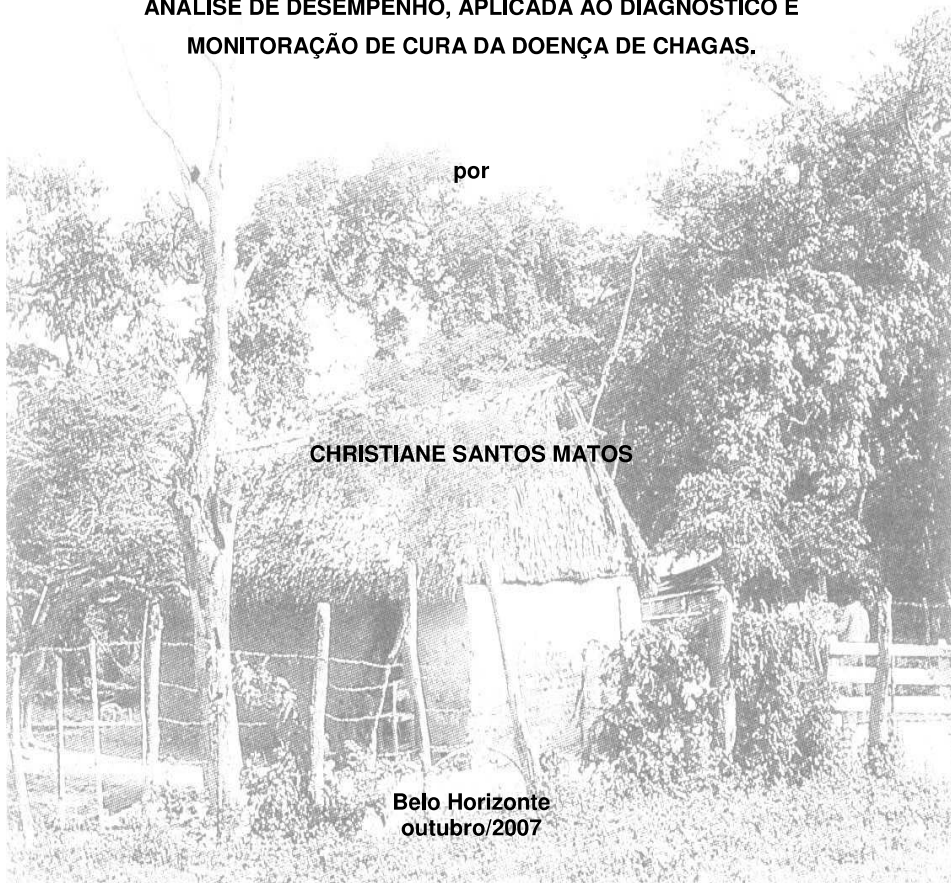
Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**PESQUISA DE IgG ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS DE  
*Trypanosoma cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO: OTIMIZAÇÃO E  
ANÁLISE DE DESEMPENHO, APLICADA AO DIAGNÓSTICO E  
MONITORAÇÃO DE CURA DA DOENÇA DE CHAGAS.**

por

**CHRISTIANE SANTOS MATOS**

**Belo Horizonte  
outubro/2007**



**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**PESQUISA DE IgG ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS DE  
*Trypanosoma cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO: OTIMIZAÇÃO E  
ANÁLISE DE DESEMPENHO APLICADA AO DIAGNÓSTICO E  
MONITORAÇÃO DE CURA DA DOENÇA DE CHAGAS**

**por**

**CHRISTIANE SANTOS MATOS**

**Belo Horizonte  
outubro/2007**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**PESQUISA DE IgG ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS DE  
*Trypanosoma cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO: OTIMIZAÇÃO E  
ANÁLISE DE DESEMPENHO APLICADA AO DIAGNÓSTICO E  
MONITORAÇÃO DE CURA DA DOENÇA DE CHAGAS**

por

**CHRISTIANE SANTOS MATOS**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências na  
área de concentração de Doenças Infecciosas  
e Parasitárias.

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Co-orientação: Dra. Mariléia Chaves Andrade

**Belo Horizonte  
outubro/2007**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**PESQUISA DE IgG ANTI-FORMAS EPIMASTIGOTAS FIXADAS DE  
*Trypanosoma cruzi* POR CITOMETRIA DE FLUXO: OTIMIZAÇÃO E  
ANÁLISE DE DESEMPENHO APLICADA AO DIAGNÓSTICO E  
MONITORAÇÃO DE CURA DA DOENÇA DE CHAGAS.**

por

**CHRISTIANE SANTOS MATOS**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho (Presidente)**

**Profa. Dra. Luciana Gouveia Viana (Faculdade de Medicina/ UFMG)**

**Profa. Dra. Marta de Lana (Escola de Farmácia – NUPEB/UFOP)**

**Suplente: Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos (Faculdade de Medicina/  
UFMG)**

**Dissertação defendida e aprovada em 01/10/2007**

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

**Francisco Xavier**

## DEDICATÓRIAS

### **Dedico este trabalho:**

- Aos meus pais, Eustáquio e Maria, pelo apoio, amor e paciência em todos os momentos da minha vida.

- Ao meu “segundo” pai, Alfredo Macedo, pelas suas palavras de conforto, pelo exemplo como ser humano, pela presença constante, sempre disposto a ajudar.

- Às minhas queridas irmãs e sobrinhos, pelo carinho e torcida.

## AGRADECIMENTOS

• Ao meu Deus, por permitir que a realização dessa dissertação fosse possível, me concedendo fé, coragem e força para enfrentar e superar os desafios e dificuldades encontradas durante esses dois anos. Dificuldades e mudanças imprevisíveis que só vieram para contribuir para a minha evolução enquanto ser humano.

• Ao Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), na pessoa do Dr. Roberto Sena, diretor da Instituição na ocasião do meu ingresso no Curso de Mestrado e toda equipe da Comissão da pós-graduação, pela oportunidade que me foi concedida para fazer parte do quadro de alunos do Curso de Mestrado do Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR-FIOCRUZ/MG.

• Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, por aceitar-me como aluna no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração. Sou grata pelos ensinamentos que contribuíram de forma expressiva para minha formação acadêmica e, sobretudo, pelo comprometimento no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela oportunidade, pelas críticas e sugestões, certa de que, apesar dos momentos difíceis, a experiência foi ímpar não apenas para o meu crescimento profissional, mas principalmente, para o meu crescimento pessoal.

• À Dra. Mariléia Chaves Andrade, que com sua luz, alegria e paciência, soube conduzir o nosso trabalho com otimismo e profissionalismo, expresso aqui a minha gratidão. Obrigada por ter me aceitado como aluna, pelos ensinamentos que também muito contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

• À Professora Dra. Sílvia Maria Santos Carvalho, pela orientação durante o período da graduação e também pelo apoio e incentivo recebidos, quando sob sua supervisão, ainda ensaiava os primeiros passos no caminho do mundo científico. Certamente, todo conhecimento que adquiri durante os dois anos de monitoria na disciplina Parasitologia Médica, foi fundamental para meu ingresso no Curso de Mestrado do CPqRR. Muito obrigada!

- À professora Maria Lena Melo Mariano pelos ensinamentos, incentivo e oportunidade de ser estagiária no Laboratório de Parasitologia Médica durante o curso de graduação.
- Ao Dr. David Pereira Neves, pela amizade, conversas e conselhos, que sempre me incentivaram a seguir rumo à carreira acadêmica. Ficam aqui registrados meus agradecimentos e admiração.
- À Dra Otamires Alves Silva, pela oportunidade de estágio do Laboratório de Parasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/PE). Aqueles momentos tão preciosos foram essenciais para a minha decisão de optar em fazer o curso de Mestrado em doenças infecciosas e parasitárias.
- Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e monitoração (LBDM), agradeço a todos pela saudável convivência, pela recepção desde o “meu primeiro dia de LBDM”, atenção e principalmente pela ajuda e palavras de conforto recebidas em todas as ocasiões que necessitei. Agradeço pelo apoio. Este trabalho tem pouco de cada um de vocês. Em particular, agradeço à Danielle Vitelli, Jordana Reis, Renato Avellar e Roberta Félix pela assistência durante a reta final deste trabalho.
- À Ana Paula Marciano e Margot pelo carinho e amizade, sempre dispostas a ouvir e ajudar.
- À amiga Valéria Andrade pela ajuda na elaboração do “abstract”.
- À Segemar pela ajuda referente aos serviços oferecidos pela Biblioteca do CPqRR. Obrigada pela atenção e dicas, que foram importantes para a conclusão deste trabalho.
- Aos meus amigos Vera, Luís, Fabiano e Lorena, que me acolheram em sua casa desde a época da seleção do Mestrado e que se tornaram amigos verdadeiros.



- De forma especial, agradeço à minha família por sempre terem me incentivado, por compartilharem os momentos difíceis que vivenciei ao longo desses dois anos aqui em Belo Horizonte, por sempre acreditarem em mim e acreditarem no meu sucesso.

- À José Eloy, que começou a fazer parte da minha vida num momento tão delicado e com muito carinho, companheirismo e paciência, assumiu um papel fundamental para o término deste trabalho.

- Muitas são as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram de forma essencial para a realização deste trabalho, seja com sugestões ou uma conversa amiga, por isso, a todos a quem eu possa ter esquecido de mencionar, de forma geral, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xviii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 População estudada.....	40
4.2 Coleta, preservação e processamento das amostras biológicas.....	41
4.3 Procedimento experimental.....	41
4.3.1 Cultivo das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41
4.3.2 Preparo das formas epimastigotas fixadas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
4.3.3 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo.....	43
4.3.3.1 Anticorpo revelador alternativo utilizado nos ensaios de citometria de fluxo.....	44
4.3.3.2 Aquisição dos dados no citômetro de fluxo.....	45
4.3.3.3 Percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP).....	47
4.4 Análises estatísticas.....	48
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Estabelecimento de alterações metodológicas para otimização da pesquisa sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de <i>Trypanosoma cruzi</i> pela citometria de fluxo (FC-AFEA-IgG).....	53
5.1.1 Natureza molecular do anticorpo secundário (conjugado).....	54
5.1.2 Faixa de diluição das amostras-teste.....	55
5.1.3 Eliminação da interferência de partículas não-relacionadas durante a seleção de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58

<b>5.2 Estabelecimento dos critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada isoladamente no diagnóstico e na monitoração de cura da doença de Chagas .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.1 Determinação da diluição empregada na FC-AFEA-IgG modificada aplicada ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....</b>	<b>61</b>
<b>5.2.2 Determinação da diluição empregada na FC-AFEA-IgG modificada aplicada à monitoração de cura da doença de Chagas .....</b>	<b>66</b>
<b>5.3 Unificação dos critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada simultaneamente no diagnóstico e na monitoração de cura da doença de Chagas.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3.1 Avaliação do desempenho da FC-AFEA-IgG modificada na diluição 1:2048 e 1:4096 para determinação da diluição consenso .....</b>	<b>71</b>
<b>5.4 Avaliação da aplicabilidade da FC-AFEA-IgG modificada na segregação sorológica de pacientes chagásicos e de indivíduos não-chagásicos portadores de outras doenças infecto-parasitárias de interesse médico .....</b>	<b>75</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>7 EVIDÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Foto da Contra-capa** – Rey, L. Protozoologia e Doença de Chagas. In: CD ROM do livro Parasitologia, 3ª edição, 2002, Ed. Guanabara Koogan.
- Figura 1** - Esquema do ciclo biológico do parasito *Trypanosoma cruzi*. As setas vermelhas indicam a multiplicação do protozoário no intestino do inseto vetor e as setas azuis, a multiplicação do protozoário dentro do hospedeiro humano (Fonte: 'American Trypanosomiasis - CDC')..... 25
- Figura 2** - Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo: seleção da população de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (R1) utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC). ..... 47
- Figura 3** - Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com um soro não-infectado (B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. .... 48
- Figura 4** - Curvas ROC dos testes 1 (linha verde) e 2 (linha azul), construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC= 0,85) e para o teste 2 (ASC=0,76)...50
- Figura 5** - Representação esquemática da 'Two Graph ROC'. IR - distância entre uma curva e outra; VRP – faixa válida do teste;  $d_0$ ,  $\theta_0$  – coordenadas ..... 51
- Figura 6** - Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* presentes em (A) 'pool' de soros de indivíduos não infectados (NI) e (B) 'pool' de soros de pacientes chagásicos (CH). As amostras de 'pool' de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG está expresso em valores de PPFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:128 e foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1:800.. ..... 55
- Figura 7** - Simulação matemática demonstrando o impacto de erros metodológicos durante o processo de diluição do soro.....56
- Figura 8** - Média das curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em de (A) soros de

indivíduos não-infectados (NI) e (B) pacientes chagásicos (CH) em função da diluição inicial da amostra. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada soro está expresso em valores de PFP. Em ambos os gráficos, as curvas de titulação com maior reatividade representam a FC-AFEA-IgG modificada (NI = ● e CH = ●) e as curvas de titulação com menor reatividade (NI = ○ e CH = ○) representam a FC-AFEA-IgG original. Foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1.....57

**Figura 9 -** ‘Dots plots’ mostrando a seleção da população de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em gráficos de tamanho (FSC) ‘versus’ granulocidade (SSC) na FC-AFEA-IgG original (A) e tamanho (FSC) ‘versus’ fluorescência 3 (FL3) na FC-AFEA-IgG modificada (B). Em A, a elipse preta delimita a população de epimastigotas (azul) não separada dos ‘debris’; em B, a elipse preta delimita apenas a população de epimastigotas. O retângulo pontilhado delimita os ‘debris’ (vermelho) .....58

**Figura 10 -** Histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência (FL1) em função do número de parasitos de amostras: controle do conjugado, indivíduo não-infectado e paciente chagásico sem ou com marcação dos parasitos com azul de Evans. A linha pontilhada indica o limiar de reatividade estabelecido pelo controle do conjugado.....60

**Figura 11 -** Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) ‘pool’ de soros de indivíduos não infectados (NI) e (B) ‘pool’ de soros de pacientes chagásicos (CH). As amostras de ‘pool’ de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada ‘pool’ está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16. As curvas de titulação de maior reatividade representam a FC-AFEA-IgG modificada (NI = ● e CH = ●) e as curvas de titulação com menor reatividade (NI = ○ e CH = ○) representam a FC-AFEA-IgG original. Foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1:800...61

**Figura 12 -** Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) soros de indivíduos não infectados (NI = ●) e (B) pacientes chagásicos (CH = ●). As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.....62

- Figura 13 -** Curvas ROC da FC-AFEA-IgG modificada construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade, dos grupos NI e CH nas diluições 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192, 1:16.384 e 1:32.768. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC representam o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a FC-AFEA-IgG. A linha vermelha seleciona as diluições que obtiveram os melhores índices de desempenho, onde: Sens = sensibilidade; Esp = especificidade; PC = ponto de corte.....64
- Figura 14 -** Curvas de titulação das reatividades médias dos grupos NI (●) e CH (●). O quadrado pontilhado indica as diluições-candidatas selecionadas de acordo com parâmetros relacionados com índices de desempenho na figura 13. O quadrado cinza seleciona as diluições que tiveram valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) acima de 80%: 1:1.024, 1:2.048 e 4.096. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.....65
- Figura 15 -** Análise da reatividade das diluições-candidatas (selecionadas por índices de desempenho + valores de  $\Delta$  de PFP maiores que 80%) dos grupos NI (●) e CH (●) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de cortes sugeridos pela curva ROC. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.....66
- Figura 16 -** Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) soros de pacientes chagásicos tratados curados (TC = ●) e (B) soros de pacientes chagásicos tratados não-curados (TNC = ●). As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.....67
- Figura 17 -** Curvas ROC de FC-AFEA-IgG modificada construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade, dos grupos TC e TNC nas diluições 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192, 1:16.384 e 1:32.768. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC representam o melhor ponto de

corte sugerido pela curva para a FC-AFEA-IgG. A linha vermelha seleciona as diluições que obtiveram os melhores índices de desempenho, onde: Sens = sensibilidade; Esp = especificidade; PC = ponto de corte.....68

**Figura 18 -** Curvas de titulação das reatividades médias dos grupos TC (●) e TNC (○). O retângulo pontilhado indica as diluições-candidatas selecionadas de acordo com parâmetros relacionados aos valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) que melhor segregaram os grupos TC e TNC. O quadrado cinza seleciona as diluições que tiveram valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) acima de 60%: 1:2.048, 4.096 e 1:8.192. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.....69

**Figura 19 -** Análise da reatividade das diluições candidatas dos grupos TC (●) e TNC (○) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de cortes sugeridos pela curva ROC. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.....70

**Figura 20 -** Gráficos de dispersão das diluições-candidatas que apresentam a melhor segregação entre os grupos NI (●) e CH (●), no âmbito do diagnóstico e TC (●) e TNC (○), no âmbito da monitoração de cura. A linha vermelha acima seleciona as diluições compartilhadas por ambos os grupos. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP.....71

**Figura 21 -** Análise do desempenho, nas diluições compartilhadas, em população constituída pelo somatório de grupos com perfil semelhante de reatividade sorológica (NI+TC = ● e CH+TNC = ●). A linha vermelha acima seleciona a diluição que apresentou os melhores índices de desempenho. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. PC = ponto de corte.....72

**Figura 22 -** Análise do desempenho TG-ROC na diluição selecionada (1:2.048) em população constituída pelo somatório de grupos com perfil semelhante de reatividade sorológica (NI + TC e CH + TNC) para definição do ponto de corte. As linhas vermelha e azul representam, respectivamente, os índices de sensibilidade e especificidade da metodologia. Sens.= sensibilidade; Esp.= especificidade. ....74

- Figura 23 -** Determinação da amplitude do ponto de corte de trabalho da técnica FC-AFEA-IgG modificada pela análise da Razão de Verossimilhança fornecida pela TG-ROC. As linhas vermelha e azul indicam, respectivamente, as Razões de Verossimilhança Positiva do grupo CH + TNC e Negativa do grupo NI + TC. RV+ = Razão de Verossimilhança Positiva; RV- = Razão de Verossimilhança Negativa. ....75
- Figura 24 -** (A) curva ROC da FC-AFEA-IgG modificada numa amostragem populacional que inclui soros de indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim, a área sobre a curva (ASC) para a FC-AFEA-IgG na diluição 1:2.048. (B) Reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos não chagásicos (NCH = ●) e pacientes chagásicos (CH = ●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>60%) e negativos (PFP≤60%). O retângulo pontilhado representa os resultados falso-positivos.....76
- Figura 25 -** Curvas de titulação de reatividade IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em (A) soros de indivíduos não-chagásicos (NCH = ●) e (B) soro de pacientes chagásicos (CH = ●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>60%) e negativos (PFP≤60%).....78
- Figura 26 -** Curvas de titulação de reatividade IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos portadores de outras doenças parasitárias: esquistossomose mansônica (○), malária (●), toxoplasmose (●), HTLV (●), HIV (●), hepatite B (●), hepatite C (○), sífilis (●), leishmaniose visceral (●) e leishmaniose tegumentar (○) na diluição do soro 1:2.048, destacada pelo retângulo cinza. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>60%) e valores negativos (PFP≤60%). .....79
- Figura 27 -** Análise da reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos não infectados (NI = ●), chagásicos (CH = ●) e portadores de outras doenças infecto-parasitárias: esquistossomose mansônica (ESQ = ●), malária (MAL = ●), toxoplasmose (TOX = ●), indivíduos infectados pelo HTLV (HTLV = ●), indivíduos infectados pelo HIV (HIV = ●), hepatite B (HBC = ●), hepatite C (HCV = ○), sífilis (SIF = ●),



leishmaniose visceral (LV = ●) e leishmaniose tegumentar (LT = ○), na diluição do soro 1:2.048. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP>60%) e valores negativos (PFP≤60%). O quadrado pontilhado indica os resultados falso-positivos.....80

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - ANTICORPO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
<b>TABELA 2</b> - AJUSTES NO CITÔMETRO DE FLUXO FACSCAN PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Trypanosoma cruzi.....	46
<b>TABELA 3</b> - ÍNDICES DE DESEMPENHO, EM DIFERENTES DILUIÇÕES, DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS POR Trypanosoma cruzi.....	73
<b>TABELA 4</b> - ÍNDICES DE DESEMPENHO DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA DILUIÇÃO 1:2.048 PARA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS PELO Trypanosoma cruzi.....	77
<b>TABELA 5</b> - ÍNDICES DE DESEMPENHO DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA DILUIÇÃO 1:2.048, PARA AVALIAÇÃO DE UMA AMOSTRA POPULACIONAL QUE INCLUI PACIENTES PORTADORES DE OUTRAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual  
AcP - Anticorpo policlonal  
ASC - Área sob a curva  
CDC - Center for Disease Control  
CH - Pacientes Chagásicos  
CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou  
Curva ROC - Receiver Operating Characteristic Curve  
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)  
ELISA-rec - Enzyme linked immunosorbent assay-rec (Ensaio imunoenzimático recombinante)  
EPI - Formas epimastigotas  
Esp - Especificidade  
ESQ - Pacientes portadores de esquistossomose mansônica  
FC-AFEA-IgG - Pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi por citometria de fluxo  
FC-ALTA-IgG - Pesquisa de IgG anti-formas tripomastigotas vivas de Trypanosoma cruzi por citometria de fluxo  
FL1 - Fluorescência 1  
FL3 - Fluorescência 3  
FITC - Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FML - Fucose manose ligante  
FSC - Forward Scatter (tamanho)  
HAI - Hemaglutinação indireta  
HBV - Pacientes portadores do vírus hepatite B  
HCV - Pacientes portadores do vírus hepatite C  
HIV - Pacientes portadores do vírus HIV  
HTLV - Pacientes portadores do vírus HTLV  
IC - Intervalo de confiança  
INCOSUR - Iniciativa Intergubernamental del Cono Sur  
IFI - Imunofluorescência indireta  
IgG - Imunoglobulina G

IgG1 - Imunoglobulina G1  
IgG2 - Imunoglobulina G2  
IOC - Instituto Oswaldo Cruz  
J de Youden - Índice J de Youden  
LBDM - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração  
LIT - Liver infusion tryptose medium (meio de infuso de fígado)  
LOG - Logaritmo  
LT- Pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana  
LV - Pacientes portadores de leishmaniose visceral  
M1 - Marcador  
MAL - Pacientes portadores de malária  
MFF - Max Facs Fix (fixador)  
MS - Ministério da Saúde  
NI - Indivíduos não-infectados  
NCH - Indivíduos não-chagásicos  
NT – Pacientes chagásicos não-tratados  
PBS - Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina)  
PBS-3% SFB - Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina suplementado com 3% de soro fetal bovino)  
PC - Ponto de corte  
PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)  
PPFP - Percentual de parasitos fluorescentes positivos  
R1 - População de interesse  
rpm - Rotações por minuto  
RV - Razão de Verossimilhança  
RV(+) - Razão de Verossimilhança Positiva  
RV(-) - Razão de Verossimilhança Negativa  
Sens - Sensibilidade  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SIF - Pacientes portadores de sífilis  
SSC - Side Scatter (granulosidade)  
TC - Pacientes tratados-curados  
TG-ROC - Two Graph-Receiver Operating Characteristic Curve  
TOX - Pacientes portadores de toxoplasmose

TNC – Pacientes chagásicos tratados não-curados  
WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

## RESUMO

Um dos grandes desafios enfrentados por pesquisadores no campo da propedêutica sorológica complementar tem sido a busca da melhor preparação antigênica para as aplicações no âmbito do imunodiagnóstico de doenças infecto-parasitárias visando maior sensibilidade e especificidade dos testes. Uma nova metodologia de pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas fixadas (FC-AFEA-IgG), baseada na citometria de fluxo, tem se mostrado um instrumento alternativo para o diagnóstico e monitoração de cura da infecção crônica por *Trypanosoma cruzi*. Dando continuidade a esta investigação, o objetivo desse trabalho foi otimizar e avaliar os índices de desempenho da FC-AFEA-IgG, principalmente no que se refere ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Neste estudo, foram selecionados um total de 255 indivíduos, dentre eles, 52 pacientes adultos cronicamente infectados por *T. cruzi* (CH) e 41 indivíduos não-infectados (NI) para avaliação da FC-AFEA-IgG no diagnóstico. Para a avaliação na monitoração de cura pós-tratamento etiológico da doença de Chagas, foram analisadas 24 amostras de soro de pacientes tratados curados (TC) e 17 amostras de soro de pacientes tratados, porém, não-curados (TNC). Adicionalmente, foram testadas 121 amostras de soro de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias: esquistossomose mansônica, malária, toxoplasmose, HLTV, HIV, Hepatite B, Hepatite C, sífilis, leishmanioses visceral e tegumentar. Todas as amostras foram submetidas a testes de sorologia convencional específicos para o diagnóstico da doença de Chagas. Os resultados de otimização demonstraram que alterações metodológicas relacionadas com a utilização de anticorpo secundário anti-Fc-IgG, a ampliação da faixa de diluição das amostras-teste (1:16 a 1:32.768) e eliminação de 'debris' pela utilização do corante vital azul de Evans para marcação dos parasitos, permitiram melhor desempenho da FC-AFEA-IgG modificada quando comparada com a original. Em síntese, nossos resultados demonstraram que, empregando a diluição do soro 1:2.048 e o valor de 60% de PFPF como ponto de corte, o estudo da reatividade sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* aplica-se ao diagnóstico e à monitoração de cura pós-tratamento etiológico da doença de Chagas com índices de sensibilidade e especificidade de 97,1% e 95,4%, respectivamente.

## ABSTRACT

One of the highest challenges observed by the researchers at the complementary serologic propedeutic have been the search for a better antigenic preparation to the applications on the infectious diseases immunodiagnostic aiming higher tests sensibility and specificity. A new research approach of fixed anti-forms epimastigotes IgG antibodies (FC-AFEA-IgG) based on flow cytometry has been showed to be an alternative tool to diagnosis and monitoring of cure of chronic infection by *Trypanosoma cruzi*. In order to continue such investigation, this study aims optimize and statistically evaluate the FC-AFEA-IgG, principally regarding serologic diagnosis of Chagas disease. It was selected a total of 255 subjects, 52 adults chronically infected by *T. cruzi* (CH) and 41 non-infected (NI) adults, to evaluate FC-AFEA-IgG on the diagnostic. To evaluate the monitoring of post-treatment cure, 24 serum samples of cured treated patients (CT) and 17 serum samples of non-cured treated patients (NCT) were analyzed. Additionally, it was tested 121 serum samples infected by others infectious disease; schistosomiasis, malaria, toxoplasmosis, HTLV, HIV, HBV, HCV, syphilis, visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis. All samples were submitted to conventional serology tests specific to Chagas disease diagnosis. The optimization results showed that the methodological alterations related to the secondary antibody anti-Fc of IgG use, the increase dilution layer of sample-tests (1:16 to 1:32.768) and debris elimination by the use of Evans blue dye to parasite mark allowed a better work of FC-AFEA-IgG modified when compared to the original. In summary, the results showed that by using the serologic dilution at 1:2.048 and the value of 60% of PFPF as a cut-off, the study of serological reactivity of *T. cruzi* fixed anti-forms epimastigotes IgG is applied to the diagnosis and monitoring of post-treatment cure of Chagas' disease, with sensibility and specificity values of 97,1% and 95,4%, respectively.

---

## 1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, descoberta em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, é uma parasitose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas representa importante problema de saúde pública, sendo a quarta moléstia de maior impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias prevalentes na América Latina. Estima-se que a prevalência da infecção humana seja cerca de 9 milhões de casos e que aproximadamente 40 milhões de pessoas ainda permanecem sob o risco da infecção (Schofield et al. 2006).

O mecanismo natural de transmissão da doença acontece através da via vetorial, ou seja, pelo contato do hospedeiro vertebrado com fezes e/ou urina do inseto vetor contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*. Os vetores são insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Mais de 140 espécies de triatomíneos já foram descritas e todas são vetoras em potencial do protozoário (Costa et al. 2006; Costa & Felix 2007; Forero et al. 2004; Galvão & Ângulo 2006; Galvão et al. 2003; Martínez et al. 2007; Sandoval et al. 2007). A grande maioria dos triatomíneos ocupa o ambiente natural e estão relacionadas a diferentes animais silvestres. Entretanto, devido à constante degradação ambiental ocasionada pela ação humana, muitas espécies têm se estabelecido nos peridomícilios, trazendo novos desafios aos programas de controle e erradicação da doença (Dias 1988, Forattini 1980). Destaca-se a importância, sob ponto de vista epidemiológico, das espécies secundárias que apresentam maior antropofilia, dentre estas, os gêneros *Panstrongylus* (*P. megistus*), *Rhodnius* (*R. prolixus*) e *Triatoma* (*T. brasiliensis* e *T. sordida*) (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005, Moreno & Carcavallo 1999, Sherlock 2000).



Quando se estudam os métodos de infecção pelo *T. cruzi* observam-se vias alternativas de transmissão além da vetorial, como: transfusional, oral, congênita, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais. Dentre estas, as vias transfusional e oral tem ganhado importância epidemiológica nas últimas décadas. A transmissão transfusional é considerada a segunda via mais freqüente de infecção, tendo especial importância epidemiológica, uma vez que pode levar a doença para áreas não endêmicas (Schmunis 1999, Schmunis & Cruz 2005, Schmunis et al. 1998, Schofield & Dias 1999, Vinhaes & Dias 2000, Wendel et al. 1997). Nas últimas décadas, a doença expandiu-se por vários países em virtude dos movimentos migratórios humanos. O crescente número de indivíduos infectados e o risco real de contaminação por transfusões sanguíneas (Dias et al. 2002) foram determinantes para o surgimento da "Iniciativa Intergubernamental del Cono Sur" (INCOSUR) em 1991. Formado por seis países latino-americanos, este grupo teve como propósito elaborar um plano de ação para a eliminação do principal vetor da doença de Chagas, *Triatoma infestans*, além de interromper a transmissão pela via transfusional (Silveira 2002). Desde então, têm-se aplicado métodos de eliminação dos insetos vetores, como o uso de inseticidas e práticas para melhorar a qualidade da triagem de sangue. A transmissão do *T. cruzi* por via oral tem caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo deste parasita, através da ingestão - por mamíferos suscetíveis - de vetores e reservatórios infectados. No caso do homem, esta transmissão ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções. Desde o relato de Mazza e colaboradores (1936), sobre transmissão por leite materno, outras observações assinalaram casos de transmissão oral em Teutônia (RS), no Pará, no Amazonas, na Paraíba e em outros países como Colômbia, Argentina e México. Sendo mais recente o registro de um surto em Santa Catarina (Dias 2006b, Steindel et al. 2008).

Em regiões onde os programas de controle dos vetores da doença de Chagas ainda são ineficientes, a infecção se dá principalmente pela via vetorial. Os vetores se infectam quando formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas durante o repasto no hospedeiro vertebrado infectado (figura

1). Uma vez no intestino posterior do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas, multiplicam-se por divisão binária e, posteriormente, sofrem alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em tripomastigotas metacíclicas. Estas últimas formas se encontram na ampola retal do inseto e estão aptas para infectar um hospedeiro vertebrado, como exemplo, o homem. Durante o repasto sangüíneo, o parasito é eliminado junto com as fezes e urina do vetor, penetrando na pele pelo local da picada, ou em mucosas íntegras, infectando diversos tipos de células. No interior das células do hospedeiro, as formas tripomastigotas se transformam em amastigotas, destroem a membrana do vacúolo parasitóforo para o citoplasma onde se inicia um processo de divisão binária simples longitudinal. Após a multiplicação, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas, rompem a membrana da célula e caem na circulação sangüínea, podendo infectar novas células, serem destruídas pelo sistema imune ou ainda serem ingeridas por outro inseto vetor dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (Brener 1973, Dias 1934, Garcia et al. 1991).

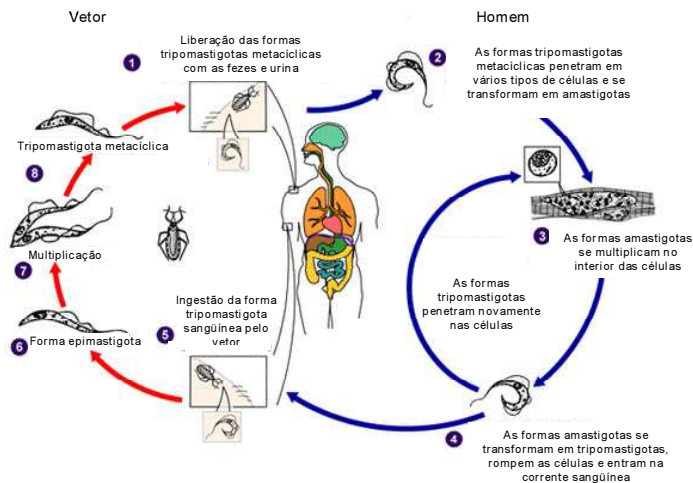


Figura 1 - Esquema do ciclo biológico do parasito *Trypanosoma cruzi*. As setas vermelhas indicam a multiplicação do protozoário no intestino do inseto vetor e as setas azuis, a multiplicação do protozoário dentro do hospedeiro humano (Fonte: 'American Trypanosomiasis - CDC').

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é o período inicial da moléstia e caracteriza-se pela relativa facilidade com que se evidencia o *T. cruzi* no sangue periférico. Manifestações sistêmicas como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, miocardite e meningoencefalite podem também ser observadas (Andrade 2000b, Prata 1990; Rezende & Rassi 1994). A presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico, é considerada indicativa da fase aguda, particularmente quando associada às alterações clínicas e epidemiológicas sugestivas.

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas e diminuição da parasitemia. Observa-se também a elevação de anticorpos específicos da classe IgG, com o subsequente decréscimo dos mesmos ao longo da cronificação da doença. Mais de 90% dos pacientes com manifestações clínicas da fase aguda sobrevivem à infecção inicial. Pouco a pouco os parasitos tornam-se escassos no sangue periférico, a sintomatologia se atenua e após algum tempo, em média 2 a 4 meses, a doença entra em um período de latência clínica e torna-se crônica. Após permanecerem assintomáticos por vários anos, cerca de 30% dos pacientes chagásicos podem apresentar sintomatologias relacionadas com os sistemas cardiocirculatório (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva) ou ambos (forma cardiodigestiva ou mista). Isto devido ao fato de mudar inteiramente a anatomia e fisiologia do miocárdio e do tubo digestivo (esôfago e cólon, principalmente) (Andrade 2000b, Brener 2000).

Acredita-se que as manifestações patológicas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas, sejam conseqüência de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo como aspectos considerados de alta

relevância. Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o sexo e especialmente as características imunológicas e genéticas (Andrade 2000).

A infecção por *T. cruzi* mobiliza diversos mecanismos humorais e celulares das respostas imunes inata e adaptativa. Em decorrência, observa-se uma intensa resposta imune com o objetivo de conter o parasito e os danos da infecção. Dessa forma, o parasito determina a ativação de macrófagos e células 'natural killer', acompanhado de ativação de linfócitos T e B, o que resulta na produção de imunoglobulinas. Com relação à imunidade humoral, tem sido descrito, que o surgimento de IgM e IgG são precoces (sete a quinze dias após infecção) atingindo níveis elevados a partir da quinta semana de infecção coincidindo esta elevação com o aumento da parasitemia, detectável ao exame a fresco. Alguns meses após a infecção (três ou mais) e depois da relativa queda da parasitemia, os níveis de IgM diminuem progressivamente em pacientes chagásicos crônicos. Estudos mostram que, anticorpos IgG aumentam por mais alguns meses e depois decrescem lentamente estabilizando-se em níveis variáveis de hospedeiro para hospedeiro, podendo ser detectáveis pelos testes sorológicos ao longo da infecção (Castro 1999 2001 2005, Golgher & Gazzinelli 2004, Lauricella 1998).

Além dos desafios sócio-econômicos que agravam ainda mais o problema da doença de Chagas (Schofield & Dias 1999), o diagnóstico desta parasitose apresenta lacunas importantes, uma vez que até o momento não existe um método laboratorial que possa ser usado como "método-referência". Para um diagnóstico definitivo seguro, é necessária a associação de vários elementos relacionados aos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (parasitológico e imunológico) da doença (Luquetti & Rassi 2000).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio da pesquisa do parasito ou através da avaliação da resposta imune-humoral pela identificação de anticorpos contra o parasito, sendo ambos os métodos

dependentes da fase clínica da infecção. Devido à intensa parasitemia na fase aguda da doença, o diagnóstico parasitológico, é facilmente realizado pela demonstração direta de formas tripomastigotas do *T. cruzi* em amostras de sangue. São utilizados os métodos diretos de observação como, por exemplo, o exame a fresco, micro-hematócrito, método de Strout e a gota espessa ou esfregaço sangüíneo corados com Giemsa. Por outro lado, na fase crônica, devido à escassa parasitemia, os parasitos podem ser identificados por métodos indiretos, como, por exemplo, o xenodiagnóstico, hemocultura, a reação em cadeia da polimerase (PCR), além de inoculação em camundongos (Luquetti & Rassi 2000).

O xenodiagnóstico foi introduzido por Brumpt (1914), sofrendo diversas modificações (Dias 1940, Maekelt 1964) ao longo dos anos para otimização da técnica. Este teste é realizado com ninfas de triatomíneos, criadas em laboratório e alimentadas com sangue de aves, as quais são refratárias à infecção pelo *T. cruzi*. Estas ninfas são colocadas para sugar diretamente o sangue do paciente. Após um período de 4 a 6 semanas, as fezes e os intestinos dos insetos são examinados por microscopia direta para pesquisa de *T. cruzi*. De acordo com diferentes estudos, a positividade do teste pode variar de 9% a 87,5% (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003). O xenodiagnóstico foi um método bastante utilizado, entretanto, além de reações adversas dos indivíduos aos triatomíneos, o alto custo operacional para a manutenção das colônias dos insetos e a dificuldade de sua padronização, o seu uso foi limitado e voltado para estudos científicos (Chiari 1992).

A hemocultura começou a ser utilizada na década de 50, com resultados inicialmente inferiores aos obtidos pelo xenodiagnóstico (Chiari & Galvão 1997). Dependendo das modificações metodológicas estabelecidas, esta técnica alcança, na fase crônica da doença, 0% a 94% de positividade (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003). Em 1972, Albuquerque e colaboradores encontraram positividade de 97,4% em 38 chagásicos na fase crônica utilizando seis coletas de sangue de cada paciente num intervalo de 30 dias. Tais resultados não foram confirmados por outros pesquisadores,

mas estimularam novos estudos por Mourão & Mello (1975) e Chiari & Dias (1975) que encontraram positividade de 45% e 43,7%, respectivamente. A introdução de modificações técnicas como a retirada do plasma, a coleta de maior volume (30 mL) de sangue e o processamento a 4°C foram responsáveis pelo aumento da sensibilidade (Chiari et al. 1989, Luz et al. 1994). Os estudos de Luz e colaboradores (1994) demonstraram a importância do processamento rápido também a 4°C, em material coletado de 52 indivíduos chagásicos crônicos, obtendo 79% e 94% de positividade quando realizaram uma única hemocultura ou com três amostras, respectivamente.

Com o avanço da biologia molecular, novas técnicas utilizadas no diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias foram aprimoradas e descritas. Dentre estas técnicas, destaca-se a PCR, que vem sendo aplicada em várias áreas e situações (Britto et al. 1999, Mullis & Fallona 1987, Saiki et al. 1995). A PCR é uma ferramenta que pode ser utilizada na detecção de *T. cruzi* no sangue de pacientes crônicos para fins de diagnóstico e acompanhamento do tratamento específico (Meira et al. 2004, Moser et al. 1989). Dados iniciais mostraram PCR positiva em 83 a 100% dos pacientes chagásicos (Ávila et al. 1993). Apesar disso, poucos trabalhos têm mostrado que a PCR, por ser uma técnica sensível, pode ser utilizada como um método de avaliação de cura em pacientes submetidos ao tratamento (Britto et al. 1995, Britto et al. 1999); ou como um método de detecção de falha terapêutica (Galvão et al. 2003). A PCR tem-se apresentado como uma alternativa no controle pós-terapêutico pela sua maior sensibilidade frente aos outros testes parasitológicos, por esses apresentarem baixa sensibilidade com resultados negativos e por vezes inconclusivos após o tratamento (Britto et al. 1995, Gomes et al. 1999). Contudo, sua utilização na rotina diagnóstica é restrita pela necessidade de infra-estrutura adequada, facilidade de contaminação e custo elevado. Paralelamente, a variabilidade de resultados pela PCR observados em diferentes regiões do Brasil suscita questões relativas à sua aplicação ao diagnóstico (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003).

A inoculação de sangue em camundongos ou cobaias jovens tem sido utilizada por alguns pesquisadores como um método alternativo para isolamento do parasito. Face aos avanços científicos atuais, esta metodologia não é mais empregada para o diagnóstico da infecção chagásica. Entretanto, esta metodologia pode ser perfeitamente utilizada para o isolamento de amostras de *T. cruzi* a partir de amostras de sangue a serem testadas, tanto de pacientes como de outros reservatórios do parasito (Steindel & Grisard 2001).

A detecção dos anticorpos na fase crônica pode ser realizada através de várias técnicas sorológicas, as quais apresentam bons índices de sensibilidade e especificidade. Apesar disso, a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos tem sido demonstrada (Chiller et al. 1990, Vexenat et al. 1996). Além disso, o desempenho destes testes pode variar em função dos reagentes, procedimentos técnicos e critérios de avaliação. Atualmente, os métodos mais empregados para o diagnóstico da infecção crônica pelo *T. cruzi* bem como para triagem de doadores em banco de sangue, são a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e os ensaios imunoenzimáticos – ‘Enzyme Linked Immunosorbent Assay’ (ELISA) (Luquetti & Rassi 2000).

O teste de imunofluorescência foi estabelecido como um teste diagnóstico para a doença de Chagas através dos trabalhos de Camargo (1966). Uma vez que a qualidade da microscopia de fluorescência e dos antígenos, a diluição correta do conjugado e o critério de leitura das lâminas apresentam valiosa contribuição para o desempenho da IFI, deve-se manter uma padronização rigorosa para a obtenção de resultados confiáveis (Ferreira & Ávila 2001). Amato-Neto e colaboradores (2002) analisaram, através da IFI, 100 soros de pacientes chagásicos crônicos, na diluição 1:20, sendo 50 co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Foram observados resultados positivos a partir da diluição 1:20, mesmo na presença da co-infecção pelo HIV. Desta forma, os autores destacam a elevada sensibilidade do método e sugerem que é válido valorizar resultados positivos nesta diluição.

O teste de hemaglutinação foi descrito pela primeira vez por Cerisola e colaboradores em 1962 e, posteriormente, otimizado por Camargo e colaboradores (1971). Sua rápida difusão foi devido à facilidade de execução, rapidez de leitura (1 a 2h) e pelo fato de não necessitar de equipamentos adicionais. No entanto, reações cruzadas têm sido observadas com outras parasitoses, principalmente com leishmanioses. Além disso, a leitura é subjetiva, o que concorre para falhas na interpretação dos resultados (Gadelha 2003).

Os testes imunoenzimáticos tiveram ampla utilização na detecção de anticorpos após a introdução do ELISA (Engvall & Perlmann 1972), cabendo a Voller e colaboradores (1975) a sua aplicação no diagnóstico da doença de Chagas. O método de ELISA abriu amplas perspectivas na sorologia convencional por ser sensível, específico, com leitura objetiva e passível de automação (Ferreira & Ávila 2001). Existem no mercado 'kits' padronizados para utilização principalmente na triagem de doadores de sangue. Neste contexto, Oelemann e colaboradores (1998) realizaram um estudo para avaliar o desempenho dos diferentes 'kits' diagnósticos, no qual a especificidade variou de 93,3% a 100% e a sensibilidade de 97,7% a 100%, dependendo da área onde as amostras de sangue foram coletadas. Em diferentes estudos, foi constante a observação de uma elevada sensibilidade com especificidade variável (Lorca et al. 1994, Teixeira et al. 1994).

Apesar de muito aplicados, os testes sorológicos podem apresentar reatividade cruzada relacionadas à outras espécies da família Trypanosomatidae (Chiller et al. 1990, Vexenat et al. 1996). Portanto, é de extrema relevância a análise do desempenho de todo teste laboratorial. Dessa forma, alguns parâmetros intrínsecos à amostragem de estudo como a sensibilidade e a especificidade, devem ser considerados. Até o presente momento, não existe teste sorológico para doença de Chagas com 100% de especificidade e com 100% de sensibilidade, entretanto, muitos disponíveis no mercado chegam a valores satisfatórios.



Diversos trabalhos têm buscado superar as limitações de desempenho dos testes sorológicos através da busca da preparação ideal do antígeno para a pesquisa de anticorpos anti-T. cruzi e conseqüente melhoria das metodologias empregadas na rotina laboratorial (Gomes 1996 1997).

Entre as novas metodologias diagnósticas que têm surgido, podemos citar os testes de ELISA utilizando antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos (Luquetti & Rassi 2000). Na última década, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, os problemas relacionados à purificação de proteínas pela bioquímica clássica foram superados. Tornou-se possível a expressão e produção em bactérias, ou em outro microrganismo, de proteínas heterólogas ou “recombinantes” com propriedades antigênicas. Esses antígenos foram desenvolvidos pelo grupo do Dr. Samuel Goldenberg do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC/FIOCRUZ e atualmente são produzidos na forma de ‘kit’ diagnóstico (EIE - Recombinante Chagas - Biomanguinhos) por Bio-Manguinhos, uma das unidades da FIOCRUZ, que detém a patente do mesmo no Brasil (BR PT 1100553-0), nos Estados Unidos (US 5736348) e na Europa (919203356.2). Outros antígenos recombinantes têm sido propostos para o diagnóstico da infecção por T. cruzi (Aguirre et al. 2006, Goldenberg et al. 1991, Nakazawa et al. 2001, Silveira-Lacerda et al. 2004, Umezawa et al. 1999).

A obtenção de um diagnóstico sorológico seguro ainda apresenta lacunas, visto que, a busca por melhores preparações antigênicas continua a ter importante relevância na predição e controle de eficácia pós-terapêutica, no esclarecimento diagnóstico e na avaliação prognóstica da infecção crônica pelo T. cruzi. Esta problemática evidencia-se nos diversos resultados díspares observados nos laudos emitidos por diferentes laboratórios utilizando os mesmos métodos sorológicos. Assim, o estabelecimento de novas metodologias para o estudo sorológico da infecção crônica por T. cruzi revela-se como um campo valioso na pesquisa clínico-laboratorial. O desenvolvimento de novos métodos mais eficientes é de fundamental importância, uma vez que a definição do diagnóstico é um dos elementos necessários para a instalação de procedimentos terapêuticos específicos,

considerando a toxicidade dos medicamentos anti-T. cruzi (Luquetti & Rassi 2000).

A introdução da citometria de fluxo por Martins-Filho e colaboradores (1995) como um método sensível para a detecção de anticorpos, trouxe uma nova perspectiva não apenas para os estudos da doença de Chagas (Cordeiro 2000), mas também para os estudos de diversas doenças parasitárias como, leishmaniose (Rocha 2005), babesiose (Bittar 2002), erliquiose canina (Moreira 2005) e também doenças causadas por vírus (Martins 2004, Silva 2005).

A citometria de fluxo é uma técnica de análise automatizada através da qual uma única partícula pode ser caracterizada física e bioquimicamente, em meio líquido. A caracterização inclui o tamanho, granulidade (ou complexidade interna) e a intensidade de fluorescência. Todos esses parâmetros podem ser detectados simultaneamente, medidos, armazenados e analisados em programas de computador. Esse método apresenta grande versatilidade, uma vez que permite o desenvolvimento de estudos que empregam tanto formas tripomastigotas vivas quanto formas epimastigotas fixadas, ou mesmo, antígenos adsorvidos em partículas sólidas (Brenner 2000).

Importantes trabalhos vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), utilizando e enfatizando a importância da citometria de fluxo. O estabelecimento de uma metodologia de detecção de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* por citometria de fluxo em soros de cães naturalmente infectados portadores de diferentes formas clínicas da leishmaniose visceral canina, por de Andrade e colaboradores (2007), demonstra que cães infectados apresentaram um valor de PFP positivo em uma ampla faixa de diluição do soro na análise de IgG total e IgG2, sendo que os testes apresentaram melhor desempenho na diluição do soro de 1:2.048. Nesta diluição, as metodologias apresentaram sensibilidade de 98%, especificidade de 100% e

acurácia de 98%. A pesquisa de IgG por citometria de fluxo tem sido avaliada para o diagnóstico de HTLV com resultados promissores (Coelho-dos-Reis et al. 2007). Além disso, a citometria de fluxo estabelece-se como uma ferramenta diagnóstica importante no âmbito clínico laboratorial, uma vez que pode ser utilizada para identificar e diferenciar subpopulações de leucócitos baseado em seus antígenos de superfície, no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de pacientes com tumores e neoplasias hematológicas (Bogh & Dulin 1993).

Com relação ao critério de cura, sabe-se que sua utilização em pacientes que foram submetidos ao tratamento é difícil devido à ausência de métodos utilizados na rotina laboratorial que possam discriminar os pacientes que curaram daqueles que não curaram (Gontijo et al. 1999). Como o principal objetivo da terapêutica específica é a erradicação do agente etiológico, o critério de cura diz respeito justamente à eliminação do *T. cruzi*, demonstrada pela negatificação pós-terapêutica definitiva dos exames parasitológicos e necessariamente, dos sorológicos específicos cujo processo pode demorar anos de observação, geralmente proporcional ao tempo de infecção (Cançado 1999). Atualmente existe um consenso de que os parâmetros utilizados para se determinar a eficácia do tratamento baseiam-se na negatificação dos testes sorológicos e parasitológicos, realizados após a terapêutica específica. Entretanto, ensaios clínicos com compostos ativos contra o *T. cruzi* têm mostrado que após o tratamento, o diagnóstico parasitológico torna-se repetidamente negativo, enquanto a SC continua positiva. Quando o parasito é detectado, fica estabelecida a falha terapêutica, independentemente dos resultados obtidos pela sorologia.

A pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo é uma metodologia não-convencional que pode ser aplicada na monitoração de cura. Esta técnica apresenta-se como um método sensível que reconhece a presença ou não de AL anti-*T. cruzi* em tripomastigotas vivos (FC-ALTA) e também a presença ou não de ASC anti-*T. cruzi* em epimastigotas fixados (FC-AFEA), aplicando-se na monitoração de cura pós-terapêutica na doença de Chagas. Martins-Filho e colaboradores (2002) observaram que todos os pacientes não

tratados ou aqueles tratados, porém não curados, apresentaram resultados positivos, enquanto todos os pacientes tratados e curados apresentaram resultados negativos.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou (LBDM-CPqRR-FIOCRUZ-MG), liderado pelo pesquisador Dr. Olindo Assis Martins-Filho, tem trabalhado com enfoque nos avanços no diagnóstico da doença de Chagas, com ênfase no desenvolvimento de métodos sorológicos alternativos como biomarcadores laboratoriais complementares no diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da infecção pelo *T. cruzi*. Em 1995, Martins-Filho e colaboradores desenvolveram uma metodologia baseada na citometria de fluxo capaz de detectar anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi*, denominada 'Flow Cytometry Anti-Live Trypomastigotes Antibodies-G' (FC-ALTA-IgG). Apesar de um bom desempenho dessa metodologia no diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica, problemas com a obtenção das formas tripomastigotas, como o caráter lábil das preparações antigênicas e o risco inerente da manipulação de formas infectantes do parasito, consistiam importantes limitações da técnica.

Como desafio tecnológico, o grupo de pesquisa investiu na adaptação da metodologia para a pesquisa de anticorpos anti-formas epimastigotas de *T. cruzi* pré-fixadas em paraformaldeído, que ficou conhecida como 'Flow Cytometry Anti-Fixed Epimastigotes Antibodies-G' (FC-AFEA-IgG). Vitelli-Avelar e colaboradores (2007) demonstraram a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG para o diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas. Para o propósito de diagnóstico da doença de Chagas, a FC-AFEA-IgG original demonstrou, na diluição do soro 1:1.024 e PFP de 60%, como ponto de corte, valores de sensibilidade e especificidade de 82% e 100%, respectivamente. Embora os índices demonstrem um desempenho moderado da FC-AFEA-IgG no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, o valor da Razão de Verossimilhança Negativo (RV-) não mostrou valor diagnóstico para o método (RV- = 0,18). A literatura traz que valores de RV- abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência da doença (Jaeschke et al. 1994).

Uma vez que os índices de desempenho sugerem um grande potencial para a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, foi de nosso interesse estabelecer alterações metodológicas na técnica original, com o propósito de refinamento metodológico, a fim de minimizar reatividades indesejadas e promover o aumento da sensibilidade.

Em conjunto, os estudos desenvolvidos por Vitelli-Avelar e colaboradores (2007) apresentam um importante avanço na aplicação de técnicas sorológicas para investigações clínicas na doença de Chagas, além de definir direções e abrir novas perspectivas no contexto do diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. Dessa forma, a FC-AFEA-IgG deve ser analisada do ponto de vista de sua utilidade quando aplicada na rotina dos serviços de saúde, principalmente nos bancos de sangue, tendo por finalidade garantir a qualidade do sangue e derivados utilizados em hemoterapia.

Entendendo a relevância dessa pesquisa e dando continuidade a essa investigação, principalmente no sentido de melhorar o desempenho da metodologia para sua aplicabilidade em diagnóstico sorológico e unificar a diluição empregada nas duas situações clínicas (diagnóstico sorológico e monitoração de cura pós-terapêutica), foi de nosso interesse realizar alterações metodológicas para otimizar a técnica, visando sua aplicabilidade no diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

---

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços alcançados no controle da transmissão vetorial da doença de Chagas, especialmente na sub-região do Cone Sul, a infecção chagásica continua sendo um importante problema de saúde pública. Ações permanentes de vigilância são necessárias para que altos patamares de controle sejam mantidos e focos emergentes eliminados (Andrade 2000a).

Outra forma de transmissão, de importância epidemiológica, que também necessita de vigilância permanente é a transfusão sanguínea. Com o fenômeno da urbanização da doença de Chagas e o crescimento da importância da transmissão transfusional do *Trypanosoma cruzi*, tornou-se importante, no Brasil, um tratamento adequado da prática hemoterápica (Dias 2006a, Sáez-Alquézar et al. 1998). Este problema era limitado à América Latina, mas com o aumento da emigração para países mais desenvolvidos, existe a possibilidade de transmissão em locais onde a doença não é endêmica, tornando-se assim um novo problema. Enquanto em muitos países, a sorologia para *T. cruzi* é obrigatória, no Chile e México, a sorologia em bancos de sangue é obrigatória apenas em áreas endêmicas (Schmunis 1999).

Diversas técnicas sorológicas tem sido usadas para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em bancos de sangue, dentre as mais utilizadas, encontram-se a hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Apesar dessas técnicas apresentarem sensibilidade superior a 95%, resultados inconclusivos são observados (Luquetti & Rassi 2000).

Mesmo se empregando dois testes de princípios distintos para diagnóstico ou para triagem em bancos de sangue, como preconizado pelo Ministério da Saúde (MS), o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* ainda apresenta importantes pontos a serem analisados (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005). No Brasil, são realizadas cerca de 2.800.000 doações por ano. Considerando uma prevalência de 1% de soropositividade,

estima-se a coleta de 28.000 unidades não-negativas, das quais 20% (5.600) são confirmadamente positivas e 80% (22.400) apresentam resultados inconclusivos. Considerando que a sensibilidade média dos testes disponíveis seja de 99%, prevê-se que 56 unidades sejam classificadas erroneamente como negativas (Andrade 2000a).

A avaliação da qualidade de testes diagnósticos é um tema de interesse da pesquisa clínica e epidemiológica. Dando continuidade à pesquisa realizada por Vitelli-Avelar e colaboradores (2007), com o propósito de otimizar a FC-AFEA-IgG, propusemos estabelecer alterações metodológicas com o objetivo de melhorar os índices de desempenho. A análise da aplicabilidade da metodologia modificada através da análise em um grupo que seja composto por indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias, que possam ser confundidas com a doença em questão, contribui para o aprimoramento metodológico. E finalmente, a avaliação da metodologia na monitoração de cura pós-terapêutica contribui para o refinamento da técnica.

Empregando a FC-AFEA-IgG esperamos diminuir resultados falso-negativos, que em bancos de sangue, levariam à transfusão de sangue contaminado; diminuir resultados inconclusivos, minimizando dessa forma as etapas de repetições e conseqüentemente custos; diminuir resultados falso-positivos que causam grave problema social e, finalmente, a automação, que concorre para a obtenção de resultados mais seguros e mais rápidos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Com o intuito de contribuir para o diagnóstico sorológico durante a infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* e para a monitoração de cura pós-terapêutica, além de oferecer suporte para futuros estudos no campo da pesquisa com relação à fase crônica da doença de Chagas, este trabalho tem como objetivo geral:

“Otimizar a pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi*, por citometria de fluxo, aplicada ao diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas”.

#### 3.2 Objetivos específicos

I - Estabelecer alterações metodológicas para otimização da pesquisa sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* pela citometria de fluxo (FC-AFEA-IgG), no que se refere a:

I.a - natureza molecular do anticorpo secundário (conjugado);

I.b - faixa de diluição das amostras-teste;

I.c - eliminação da interferência de partículas não-relacionadas durante a seleção de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

II - Estabelecer os critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada isoladamente no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas;

III - Unificar os critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada simultaneamente no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas;

IV - Avaliar a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG modificada na segregação sorológica de pacientes chagásicos e de indivíduos não-chagásicos portadores de outras doenças infecto-parasitárias de interesse médico.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População estudada

Para a realização deste estudo, foram selecionados um total de 255 amostras de soro e/ou plasma. Para a avaliação da FC-AFEA-IgG no diagnóstico, utilizou-se 52 amostras de soro de pacientes adultos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (CH) e 41 amostras de soro de indivíduos não-infectados (NI). Para a avaliação da FC-AFEA-IgG na monitoração de cura pós-terapêutica, foram analisadas 24 amostras de soro de pacientes tratados curados (TC) e 17 amostras de soro de pacientes tratados, porém não-curados (TNC).

Adicionalmente, foram testadas 121 amostras de soro de indivíduos não-chagásicos, mas portadores de outras doenças infecto-parasitárias de interesse médico: esquistossomose (ESQ, n=14), malária (MAL, n=13), toxoplasmose (TOX, n=17), leishmaniose visceral (LV, n=13), leishmaniose tegumentar (LT, n=14), hepatite B (HBV, n=10), hepatite C (HCV, n=10), vírus linfotrópico humano (HTLV, n=10), sífilis (SIF, n=10), vírus da imunodeficiência humana (HIV, n=10). Essas amostras foram cedidas pelos seguintes pesquisadores do CPqRR: Dra. Andréa Teixeira (ESQ), Dra. Luzia Helena Carvalho (MAL), Dr. Olindo Assis Martins Filho (TOX), Dra. Vanessa Peruhype (LV), Dra. Célia Gontijo (LT); pela estudante de mestrado Jordana Reis (HTLV) e pelo serviço de hemoterapia do HEMOMINAS/Belo Horizonte-MG e pela Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho (HBV, HCV, SIF e HIV) sob supervisão de Beatriz Carvalho e Patrícia Carvalho. Cada amostra foi diagnosticada por exames sorológicos e/ou parasitológicos.

O grupo controle utilizado como parâmetro comparativo para as análises consistiu de amostras provenientes de triagem sorológica na Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho. Todas as amostras foram classificadas como não-reagentes segundo triagem sorológica realizada na referida instituição.

Todos os procedimentos referentes a esta pesquisa foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ sob o parecer nº 05/2007.

#### 4.2 Coleta, preservação e processamento das amostras biológicas

Todas as amostras de soro incluídas neste estudo foram colhidas por punção venosa em tubos 'Vacutainer', preservadas em geladeira a 4°C, até o processamento. Estas amostras foram inativadas a 56°C por 30 min e centrifugadas 14.000 rpm por 5 min para remoção de partículas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a - 20°C até a sua utilização.

#### 4.3 Procedimento experimental

##### 4.3.1 Cultivo das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Nos experimentos de citometria de fluxo foi utilizada a cepa CL de *T. cruzi*, isolada no Rio Grande do Sul, Brasil, a partir de um triatomíneo da espécie *Triatoma infestans* naturalmente infectado (Brenner & Chiari 1973). A cepa foi criopreservada em nitrogênio líquido no Criobanco do CPqRR e vem sendo mantida em cultivo axênico no LBDM, atualmente sob supervisão do Dr. Olindo Assis Martins Filho.

A forma epimastigota (EPI) caracteriza-se pelo seu fácil cultivo, podendo ser reproduzida em larga escala por ser uma forma não-infectante e por possuir estabilidade antigênica após a fixação. Por outro lado, por ser antigenicamente complexa, permite avaliar a variabilidade do repertório de anticorpos dos indivíduos infectados. Além disso, a cepa CL é sensível a drogas utilizadas clinicamente na doença de Chagas, como o benzonidazol (Filardi & Brenner 1987), o que oferece maior segurança ao operador.

Formas EPI foram obtidas a partir de uma cultura em meio líquido acelular, 'Liver Infusion Tryptose' - LIT (Solução a 10% em água de infuso de fígado – DIFCO<sup>®</sup>; 50,0 g de triptose – DIFCO<sup>®</sup>; 40,0 g de NaCl – SYNTH<sup>®</sup>; 4,0 g de KCl – SYNTH<sup>®</sup>; 80,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – SYNTH<sup>®</sup>; 5 mL de trietanolamina, 250,0 mg de hemina – SIGMA<sup>®</sup>; pH do meio ajustado para 7,2 com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio, solução a 40% em água de Glicose – SIGMA<sup>®</sup>; 50 mL de soro fetal bovino) (Camargo 1964) mantida no LBDM. Para a realização dos experimentos foi iniciada uma nova cultura a partir de um inóculo de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL em um erlenmeyer contendo 3 mL de meio LIT. Diariamente, as culturas foram homogeneizadas para uma melhor aeração do meio e verificadas quanto à ausência de contaminação. A cada sete dias as culturas foram examinadas quanto à ausência de contaminação e mantidas (repicadas) por passagens sucessivas em meio LIT. Antes do repique, era observada a mobilidade, quantidade e morfologia dos parasitos. Este procedimento foi repetido a cada sete dias para a manutenção das culturas em fase de crescimento exponencial e também para evitar a diferenciação das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. a temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.2 Preparo das formas epimastigotas fixadas de Trypanosoma cruzi

Os parasitos coletados na fase estacionária de crescimento, foram transferidos para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (FALCON<sup>®</sup>, BECTON DICKINSON<sup>®</sup>) e homogeneizados em vórtex (rotação 3) para desfazer os depósitos celulares. Em seguida, a suspensão foi submetida à centrifugação sob baixa rotação (200 rpm, 10 min,  $18^\circ\text{C}$ ) para remoção de partículas e de grumos de parasitos do sedimento. Posteriormente, os tubos cônicos de 50 mL foram mantidos por 10 min em estufa B.O.D.  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. Este foi transferido para outro tubo estéril de polipropileno de 50 mL e o sedimento foi desprezado. Em seguida, os parasitos foram lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato - PBS suplementado com 3% de soro bovino fetal - SBF (SIGMA<sup>®</sup>), por centrifugação sob alta

rotação (2.200 rpm, 10 min, 18°C). O sedimento formado foi cuidadosamente homogeneizado, ressuspensão em igual volume com PBS e solução fixadora para citometria (Max Facs Fix - MFF), e mantidos 'overnight' a 4°C. No dia seguinte, os parasitos foram novamente centrifugados sob alta rotação (2.200 rpm, 10 min, 18°C) para a retirada da solução fixadora e ressuspensos em PBS. A suspensão de parasitos foi então quantificada em câmara de Neubauer e em citômetro de fluxo, e ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL para o ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo. Além disso, a distribuição da população foi observada em gráficos de tamanho (FSC) 'versus' granulosidade (SSC) obtidos no citômetro de fluxo. As formas EPI fixadas foram estocadas a 4°C por um período de até 30 dias.

#### 4.3.3 Reação de imunofluorescência indireta por citometria de fluxo

Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos anti-formas epimastigotas fixadas foram realizados segundo protocolo descrito por Martins-Filho e colaboradores (1995), e adaptado para microplacas por Cordeiro e colaboradores (2001).

Em placas de 96 poços com fundo em "U", 50 µL do soro diluído em PBS-3% SBF (1:16 a 1:32.768) foram incubados a 37°C por 30 minutos e ao abrigo de luz, na presença de 50 µL da suspensão de parasitos ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL/poço). Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes, com PBS-3% SBF, por centrifugação (2.200 rpm, 10 min, 18°C) e o sobrenadante desprezado. Para análise de IgG total, os parasitos foram novamente incubados (na mesma condição anterior) na presença de uma diluição de 50 µL de anticorpo anti-IgG humano molécula específica marcado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (SIGMA®) e azul de Evans (na concentração de 100 mg/mL) diluídos em PBS-3% SBF. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com PBS-3% SBF (2.200 rpm, 10 min, 18°C) e o sobrenadante desprezado.

Após as etapas de incubação com os reagentes marcados com fluorocromos, os parasitos foram fixados com 200 µL de solução fixadora para citometria (10,0 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) e incubados por 30 min a 4°C. As amostras foram mantidas a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScan - BECTON DICKINSON<sup>®</sup>, San Jose/ CA - EUA), onde empregou-se o software 'Cell Quest'. As leituras das amostras foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos.

Para cada ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo, foi feito um controle interno da reação (controle do conjugado), onde os parasitos foram incubados na ausência de soro humano, porém na presença de anticorpo secundário, para monitorar ligações inespecíficas. Em todos os testes foram incluídas amostras controles de soros positivo e negativo para a doença de Chagas. Para assegurar a qualidade dos resultados, o citômetro de fluxo passa por processos de limpeza diário e mensal a fim de prevenir o entupimento e, concomitantemente, promover a remoção de corantes. Esta conduta é importante, principalmente, para remoção de 'debris', que podem interferir na interpretação dos resultados (Jaroszeski & Radcliff 1999).

#### 4.3.3.1 Anticorpo revelador alternativo utilizado nos ensaios de citometria de fluxo

Os anticorpos reveladores utilizados para os ensaios de imunofluorescência (FC-AFEA-IgG modificada) marcados com isotiocianato de fluoresceína – FITC foram obtidos comercialmente da SIGMA<sup>®</sup>. A titulação específica para o anticorpo policlonal anti-IgG molécula específica foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se diluições seriadas de 1:400 e 1:800. Para cada diluição foram testadas diluições seriadas (1:16 a 1:32.768) de uma mistura de soros de pacientes chagásicos (CH) e outra mistura de soros de indivíduos não-infectados (NI). A diluição do conjugado que melhor discriminou os grupos avaliados foi a diluição de 1:800, sendo, dessa forma, escolhida para a realização dos ensaios de citometria de fluxo.

O anticorpo revelador, bem como as amostras de soros, foram diluídas em PBS-3% SFB. Os conjugados foram diluídos na hora do uso em PBS-3% SBF, ao abrigo da luz. A relação de anticorpos, sua especificidade, procedência e a diluição utilizada nos ensaios estão detalhadas na tabela 1.

TABELA 1 - ANTICORPO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO.

Anticorpo	Clone	Especificidade	Origem	Marcação	Diluição de uso	Fabricante
AcP anti-IgG	-	Molécula específica	Cabra	FITC	1:800	SIGMA®
AcP anti-IgG	-	Molécula total	Cabra	FITC	1:800	BIOLAB®

AcP = anticorpo policlonal; FITC = isotiocianato de fluoresceína

#### 4.3.3.2 Aquisição dos dados no citômetro de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema ótico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios 'laser' incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC - 'Forward Scatter'), granulosidade ou complexidade interna (SSC - 'Side Scatter') e a emissão de fluorescência.

Nesse estudo foram empregados anticorpos marcados com FITC que, quando excitados, emitem sinais luminosos correspondentes à fluorescência do tipo 1 (FL1 - fluorescência verde). Os ajustes do citômetro de fluxo FACScan empregados para a aquisição dos dados foram escolhidos por se tratar de uma população de pequeno tamanho (cerca de 5-7 $\mu$ m) e de baixa complexidade interna (triplanosomatídeos), onde os ganhos de voltagem para FSC (tamanho) e SSC (granulosidade) foram ajustados para E00 e 300, ambos na escala LOG para permitir a identificação do parasito em gráficos bidimensionais do tipo FSC 'versus' SSC. O eliminador de debris foi posicionado empregando o parâmetro de tamanho, pois esta modalidade é que oferecia maiores chances de interferência durante o processo de leitura (tabela 2). É importante ressaltar que os mesmos ajustes foram empregados

para todos os experimentos, garantindo a possibilidade de um estudo comparativo com mínima variabilidade metodológica.

Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros relacionados ao tamanho, granulosidade e intensidade relativa de fluorescência de 10.000 parasitos.

TABELA 2 - AJUSTES NO CITÔMETRO DE FLUXO FACSCAN PARA AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma cruzi*.

Canal	Ganho		Eliminador de 'debris'		Compensação
	Escala	Nível	Nível		
FSC	LOG	E00	400		FL1-0,9% FL2
SSC	LOG	300	052		FL2-24,8% FL1
FL 1	LOG	549	052		FL2-0,0% FL3
FL 3	LOG	700	052		FL3-0,0% FL2

FSC ('Foward Scatter') = tamanho; SSC ('Side Scatter') = granulosidade; FL1 = fluorescência 1; FL3 = fluorescência 3; LOG = logaritmo.

A análise da reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse (figura 2). As formas EPI de *T. cruzi* apresentam uma distribuição característica e homogênea em gráficos FSC 'versus' SSC, o que permitiu o posicionamento do marcador sobre a região correspondente (janela) à população de interesse (R1). Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi possível analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada.

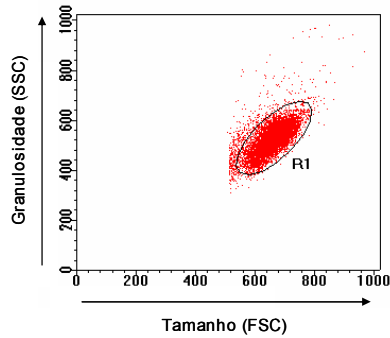


Figura 2 - Representação esquemática das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo: seleção da população de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (R1) utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC).

#### 4.3.3.3 Percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP)

Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos foram expressos sob a forma de PPFP observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento do limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (M1). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de PPFP dos títulos de cada amostra individual (figura 3). Para cada conjunto de ensaios, novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento.

Esse tipo de parâmetro oferece algumas vantagens, como facilidade e rapidez para obtenção dos resultados e sua reprodutibilidade no que se refere a dados obtidos em análises inter-laboratoriais ou em análises realizadas repetidas vezes. Além disso, a expressão dos resultados sob a forma de PPFP elimina interferências inerentes ao uso de reagentes com



diferentes níveis de fluorocromos. Todos os dados desse trabalho foram analisados utilizando o programa 'Cell Quest' da BECTON DICKINSON®.

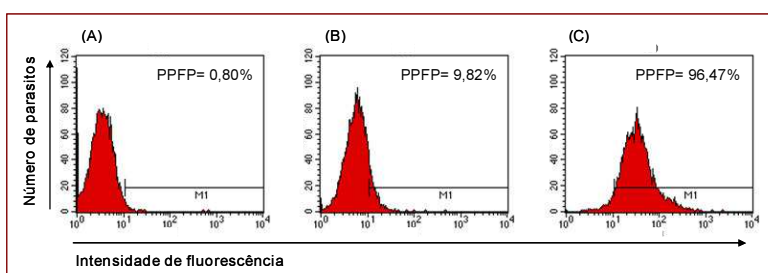


Figura 3 - Histogramas individuais representando o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PFPF) obtidos com controle interno da reação (A), após incubação com um soro não-infectado (B) e um soro de paciente chagásico (C). O posicionamento do marcador (M1) segue sempre o critério de se obter no máximo 2% de PFPF para o controle do conjugado.

#### 4.4 Análises estatísticas

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG no diagnóstico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, tornava-se essencial definir o melhor ponto de corte a ser utilizado para essa finalidade. Dentre os diversos critérios para definir um ponto de corte, um contrabalanço entre sensibilidade e especificidade é desejável. Tal definição pode ser arbitrária, mas é importante levar em consideração os propósitos do teste e as implicações dos resultados errôneos falso-positivos e falso-negativos (Browner et al. 1998, Fletcher et al. 1989, Metz 1978). Inicialmente utilizamos pontos de corte já utilizados em estudos prévios e posteriormente optamos por empregar a construção da 'Receiver Operating Characteristic curve' - curva ROC para definição do ponto de corte.

A curva ROC é uma ferramenta estatística capaz de indicar a diluição do soro que possui maior distanciamento entre o ponto de corte sugerido pela curva e seus valores adjacente e subjacente, além de fornecer a área sob a curva (Browner et al. 1998, Sackett et al. 1991, Swets 1988) e a Razão de Verossimilhança (Jaeschke et al. 1994) do teste avaliado, indicando a acurácia global, e quantas vezes é mais provável (ou menos provável)

encontrar um dado resultado na população doente em relação à população não-doente, respectivamente.

Neste estudo, foi utilizada a ferramenta de análise da curva ROC obtida pelo programa estatístico 'MedCalc Statistical'. As curvas consistiram na representação gráfica dos índices de reatividade dos grupos de diferentes amostras. Estes índices geraram a sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (falso-positivo) no eixo horizontal (Greiner et al. 2000, Greiner et al. 1981, Zweig & Campbell 1993). A especificidade de um teste sorológico é definida pela percentagem de resultados negativos pelo teste nos indivíduos não-doentes, ou seja, a proporção dos verdadeiros negativos. A sensibilidade de um teste sorológico refere-se à percentagem de resultados positivos pelo teste na população de doentes, ou seja, a proporção de resultados verdadeiramente positivos (Ferreira & Ávila 2001).

Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva - ASC. A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado. Conforme sugere Swets (1988), em função do valor da ASC podemos classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ( $ASC = 0,5$ ), de baixa acurácia ( $0,5 < ASC \leq 0,7$ ), de moderada acurácia ( $0,7 < ASC \leq 0,9$ ), de elevada acurácia ( $0,9 < ASC < 0,1$ ) e como teste perfeito ( $ASC = 1$ ). Segundo Browner e colaboradores (1998) e Sackett e colaboradores (1991), o valor correspondente ao ponto situado mais próximo do ângulo superior esquerdo da curva, trata-se do ponto de corte associado a um menor número de resultados falso-positivos e negativos.

A figura 4 mostra uma curva ROC esquemática, representando dois testes diagnósticos. A avaliação da ASC permite concluir que a ASC do teste 1 ( $ASC = 0,85$ ) é maior que a do teste 2 ( $ASC = 0,76$ ), o que significa dizer que o teste 1 apresenta melhor desempenho que o teste 2, ou seja, melhor capacidade em discriminar duas populações distintas (doente e não-doente).

As setas fora do gráfico demonstram de forma esquemática o sentido que aumenta a sensibilidade e a especificidade. Cada ponto do gráfico representa os índices sensibilidade e  $100 - \text{especificidade}$  de um ponto de corte estabelecido. O teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade / especificidade.

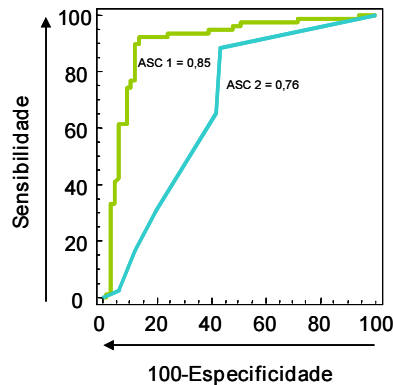


Figura 4 - Curvas ROC dos testes 1 (linha verde) e 2 (linha azul), construídas a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e  $100 - \text{especificidade}$  dos testes avaliados. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos respectivos índices determinando assim a área sob a curva (ASC) para o teste 1 (ASC 1 = 0,85) e para o teste 2 (ASC 2 = 0,76).

Para avaliar o desempenho da metodologia empregada foram utilizados índices expressos em porcentagem e em chance. Os índices expressos em porcentagem incluíram a sensibilidade =  $(\text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falso negativos})) \times 100$ ; especificidade =  $(\text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falso positivos})) \times 100$ ; Valor preditivo positivo =  $(\text{verdadeiros positivos} / \text{total de positivos}) \times 100$ ; Valor preditivo negativo =  $(\text{verdadeiros negativos} / \text{total de negativos}) \times 100$ ; Índice J de Youden =  $\{(\text{verdadeiros positivos} \times \text{verdadeiros negativos}) - (\text{falsos positivos} \times \text{falsos negativos})\} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falso positivos}) \times (\text{falsos negativos} + \text{verdadeiros negativos}) \times 100$  (Youden 1950). O índice expresso em chance foi avaliado a partir da determinação da Razão de Verossimilhança (RV). RV para o resultado positivo =  $[\text{verdadeiro positivo} / (\text{verdadeiro positivo} + \text{falso-negativo})] / [\text{falso positivo} / (\text{falso positivo} + \text{verdadeiro negativo})]$  e RV para o resultado negativo =  $[\text{falso}$

negativo/(verdadeiro positivo + falso-negativo)] / [verdadeiro negativo/(falso positivo + verdadeiro negativo)] (Greiner et al. 1995, Jaeschke et al. 1994). A literatura registra que valores de RVs superiores a 10 ou inferiores a 0,1 originam mudanças grandes e geralmente conclusivas de uma probabilidade pré-teste a uma probabilidade pós-teste da doença. RVs de 5 a 10 e de 0,1 a 0,2 originam mudanças moderadas, mas às vezes significativas. Por outro lado, RVs de 2 a 5 e de 0,2 a 0,5 geram mudanças pequenas, mas às vezes significativas e RVs de 1 a 2 e 0,5 a 1 geram mudanças muito pequenas e raramente significativas (Jaeschke et al. 1994)

Outra ferramenta estatística utilizada para a avaliação do desempenho do teste, conforme ilustrado na figura 5, foi a 'Two-Graph-ROC' (TG-ROC) proposta por Greiner e colaboradores em 1995. A TG-ROC é constituída por dois gráficos em eixos opostos, um representando a sensibilidade e outro representando a especificidade de um determinado teste em diferentes pontos de corte, que variam ao longo do eixo x do gráfico.

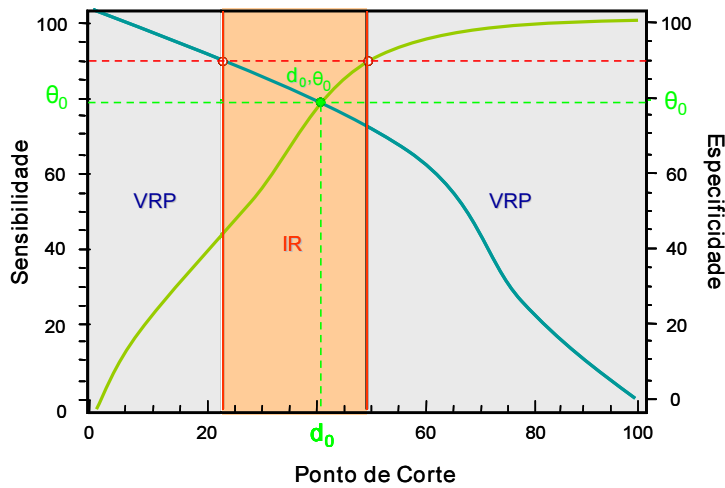


Figura 5 – Representação esquemática da 'Two Graph ROC'. IR - distância entre uma curva e outra; VRP – faixa válida do teste;  $d_0, \theta_0$  – coordenadas.

Greiner e colaboradores (1995) descrevem que, apesar de indicar o ponto de corte, a curva ROC não possibilita a visualização dos valores de

sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte. A TG-ROC, no entanto, possibilita a visualização de uma ampla faixa de valores de ponto de corte para sensibilidade e especificidade obtidas para cada um deles. O encontro destas duas curvas tem como coordenadas  $(d_0, \theta_0)$  onde  $d_0$ , corresponde ao ponto de corte no qual a sensibilidade e a especificidade  $(\theta_0)$  são iguais (em verde na figura 5).

Assim, considerando  $\theta_0 < 95\%$ , estabelece-se um valor de acurácia de 95% (linha na cor vermelha pontilhada no gráfico), ou seja, 95% de resultados corretos do teste (sensibilidade e especificidade iguais a 95%). A partir disso, é possível mensurar a distância entre uma curva e outra que será denominada IR ('Intermediate Range') em laranja na figura 5, que corresponde à faixa intermediária de valores representando resultados inválidos do teste. Ela pode ser calculada matematicamente através da faixa mensurável do teste (MR) subtraído da faixa válida do teste (VRP). Portanto, quanto menor a IR de um determinado teste, maior será a sua VRP e, conseqüentemente, melhor será o desempenho da técnica. O 'software' utilizado para a construção das curvas foi o programa estatístico CMDT (Greiner et al. 1995).

Os índices avaliados neste estudo foram expressos com seus respectivos intervalos de confiança a 95% ( $IC_{95\%}$ ) calculados pelo método do 'Fleiss Quadratic' (Fleiss 1981). Embora os valores calculados para os diferentes indicadores representem a melhor estimativa do valor real do índice, este pode corresponder (obviamente com uma probabilidade de 95%) a qualquer outro valor situado entre os extremos definidos pelo intervalo de confiança a 95%. Além de permitir a inferência do valor do índice, o intervalo de confiança a 95% também fornece informação a respeito da precisão do valor estimado, que está relacionado com a amplitude do referido intervalo, sendo que intervalos mais estreitos correspondem a estimativas mais precisas.

## 5 RESULTADOS

Os resultados desse estudo serão apresentados a seguir em quatro grupos de dados que correspondem aos objetivos específicos propostos. Em síntese, serão apresentados os resultados de otimização da metodologia FC-AFEA-IgG, de determinação da diluição empregada na metodologia modificada, de avaliação do desempenho e aplicabilidade da metodologia modificada no diagnóstico sorológico e monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, e por fim, de avaliação da aplicabilidade da metodologia modificada na segregação sorológica de pacientes chagásicos e pacientes portadores de outras doenças infecto-parasitárias. A avaliação do desempenho do teste foi feita segundo os princípios da epidemiologia clínica, procurando-se seguir com rigor todas as recomendações.

### 5.1 Estabelecimento de alterações metodológicas para otimização da pesquisa sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* pela citometria de fluxo (FC-AFEA-IgG)

No âmbito do diagnóstico laboratorial da doença de Chagas, foi desenvolvida recentemente por nosso grupo de pesquisa, uma metodologia baseada na pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas de *T. cruzi* (FC-AFEA-IgG) baseada na citometria de fluxo. Para o propósito de diagnóstico da doença de Chagas, a FC-AFEA-IgG original demonstrou, na diluição do soro 1:1.024 e PFP de 60%, como ponto de corte, valores de sensibilidade e especificidade de 82% e 100%, respectivamente (Vitelli-Avelar et al. 2007). Embora os índices demonstrem um desempenho moderado da FC-AFEA-IgG no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, o valor da Razão de Verossimilhança Negativo (RV-) não mostrou valor diagnóstico para o método (RV- = 0,18). A literatura traz que valores de RV- abaixo de 0,1 praticamente confirmam a ausência da doença (Jaeschke et al. 1994). Uma vez que os índices de desempenho sugerem um grande potencial para a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, foi de nosso interesse estabelecer alterações metodológicas na técnica original, com o propósito de refinamento metodológico, a fim de

minimizar reatividades indesejadas e promover uma melhora no seu desempenho.

A sensibilidade de um método diagnóstico depende de aspectos multifatoriais tais como o tipo, a fonte e pureza do antígeno usado, bem como de fatores intrínsecos da metodologia. Uma vez padronizado o antígeno utilizado (epimastigotas fixados), propusemos alterar condições metodológicas com o propósito de aperfeiçoar a técnica FC-AFEA-IgG para que esta pudesse ser aplicável para fins diagnósticos da doença de Chagas. As alterações intrínsecas da metodologia foram então relacionadas com a natureza molecular do anticorpo secundário (conjugado), a faixa de diluição das amostras-teste e a eliminação da interferência de partículas não-relacionadas ('debris') durante a seleção das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

#### 5.1.1 Natureza molecular do anticorpo secundário (conjugado)

A técnica FC-AFEA-IgG original foi padronizada utilizando um anticorpo revelador anti-molécula total de IgG conjugado ao fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), do fabricante BIOLAB<sup>®</sup>. Esse anticorpo é muito utilizado em estudos soro-imunológicos em laboratórios de análises clínicas. No entanto, foi de nosso interesse investigar o desempenho da FC-AFEA-IgG após utilização de um anticorpo revelador mais específico, anti-porção Fc da molécula de IgG, do fabricante SIGMA<sup>®</sup>, muito utilizado em pesquisas laboratoriais.

A figura 6 mostra os resultados obtidos quando comparamos as curvas de titulação de 'pool' de soros de indivíduos não-infectados (NI - 6A) e pacientes chagásicos (CH - 6B) empregando anticorpos anti-molécula total de IgG (BIOLAB<sup>®</sup>) na técnica FC-AFEA-IgG original e anticorpos anti-porção Fc de IgG (SIGMA<sup>®</sup>) na técnica FC-AFEA-IgG modificada, ambos conjugados com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). Interessantemente, nossos dados demonstram que, é notório, em ambos os gráficos, uma reatividade superior

de IgG da FC-AFEA-IgG modificada quando comparada com a FC-AFEA-IgG original.

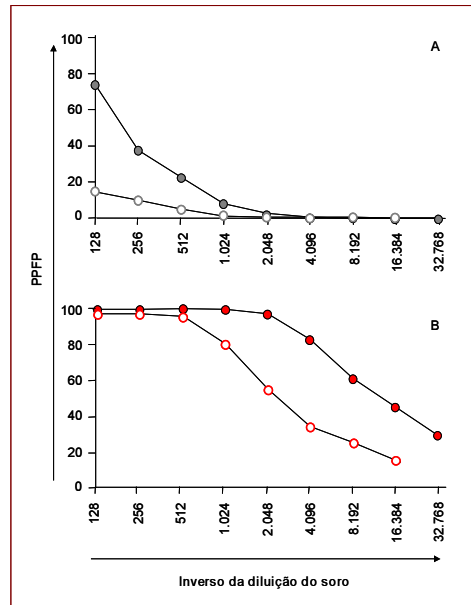


Figura 6 – Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) 'pool' de soros de indivíduos não infectados (NI) e (B) 'pool' de soros de pacientes chagásicos (CH). As amostras de 'pool' de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG está expresso em valores de PPFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:128 e foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1:800.

### 5.1.2 Faixa de diluição das amostras-teste

É sabido que muitos refinamentos metodológicos são baseados no emprego de amostras mais diluídas, a fim de reduzir reatividades interferentes. A técnica FC-AFEA-IgG original utiliza oito diluições da amostra-teste, compreendendo uma faixa de diluição que vai de 1:128 até 1:16.384. Nosso próximo objetivo foi ampliar a faixa de diluição do soro, passando a utilizar 12 diluições (1:16 a 32.768). A FC-AFEA-IgG modificada, portanto, iniciaria com uma diluição mais concentrada (1:16).



Foi de interesse, entretanto, antes de iniciar os experimentos propriamente, realizar uma simulação matemática para verificar o impacto, sobre a diluição do soro, de prováveis erros metodológicos durante o processo de pipetagem.

Dessa forma, a figura 7 mostra que um erro de pipetagem de apenas 1  $\mu\text{L}$  (para mais ou para menos), na diluição inicial do soro de 1:128 (figura 7A), altera consideravelmente o comportamento da curva de titulação, principalmente nas últimas diluições, apresentando valores bem discrepantes. Cabe ressaltar que, enquanto o valor do inverso da diluição do soro de 1.500 compreende a 5ª diluição de uma amostra, em outra amostra este valor representa a 6ª diluição. Em termos práticos, esse erro poderia resultar numa mudança da diluição de escolha para fins diagnósticos. Por outro lado, quando analisamos a diluição inicial do soro de 1:16 (figura 7B), verificamos que mesmo com um erro maior de pipetagem, em torno de 5  $\mu\text{L}$  (para mais ou para menos), as alterações observadas são mínimas e, em termos práticos, não teriam uma alteração na diluição de escolha para fins diagnósticos.

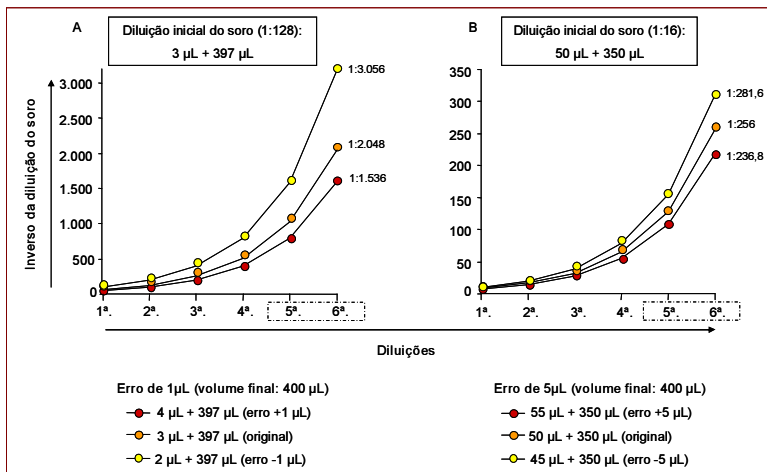


Figura 7 – Simulação matemática demonstrando o impacto de erros metodológicos durante o processo de diluição do soro.

Dentro da nossa proposta de refinamento metodológico, propusemos ampliar a faixa de diluição das amostras-teste na FC-AFEA-IgG modificada, iniciando com uma diluição mais concentrada (1:16). A figura 8 mostra uma análise comparativa dos valores médios de PFP das curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* de soros de indivíduos NI (n = 17) e pacientes CH (n = 17) pela FC-AFEA-IgG original e FC-AFEA-IgG modificada. Através das médias das reatividades obtidas pela análise pareada das populações de estudo, foi possível observar dois padrões distintos ao longo das curvas de titulação. Na figura 8A, foi possível observar maior reatividade nas primeiras diluições da técnica modificada. Já na figura 8B, foi possível observar uma maior reatividade da técnica modificada com relação à original ao longo de toda a curva de titulação.

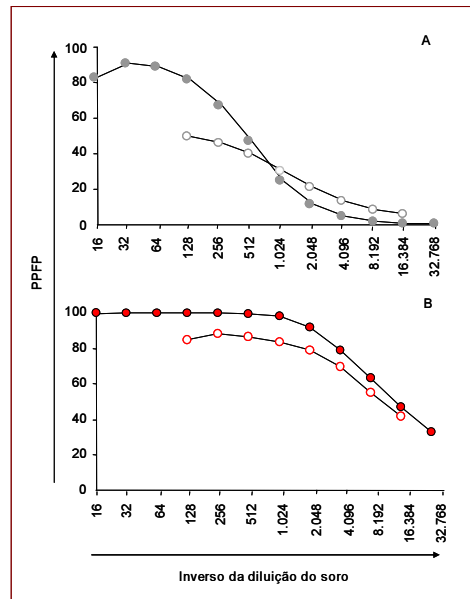


Figura 8 – Média das curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* presentes em (A) soros de indivíduos não-infectados (NI) e (B) pacientes chagásicos (CH) em função da diluição inicial da amostra. As amostras individuais de soros (NI = 17 e CH = 17) foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada soro está expresso em valores de PFP. Em ambos os gráficos, as curvas de titulação com maior reatividade média representam a FC-AFEA-IgG modificada (NI = ● e CH = ●) e as curvas de titulação com menor reatividade (NI = ○ e CH = ○) representam a FC-AFEA-IgG original. Foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1:800.

### 5.1.3 Eliminação da interferência de partículas não-relacionadas durante a seleção de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A seleção da população de epimastigotas na FC-AFEA-IgG-original é realizada através da análise de características morfométricas (figura 9A) em gráficos de tamanho (FSC) 'versus' granulosidade (SSC), não discriminando partículas não-relacionadas ('debris') que podem interferir na análise. Para solucionar essa questão e garantir uma maior homogeneidade durante a seleção da população de interesse, na FC-AFEA-IgG-modificada, resolvemos durante o procedimento experimental, marcar o parasito com o corante vital azul de Evans. Os 'debris' de parasitos rompidos, fragmentos de fibrina e partículas em suspensão que eventualmente poderiam reduzir o percentual de parasitos fluorescentes, não coram com o azul de Evans e podem ser eliminados através do canal de fluorescência 3, não empregado na análise de reatividade que utiliza o canal de fluorescência 1 (FITC). A mudança na forma de seleção da população de epimastigotas (figura 9B), que passou a ser por parâmetros de tamanho (FSC) 'versus' fluorescência (FL3), contribuiu para uma maior homogeneidade da população de interesse, eliminando a contaminação de partículas não-relacionadas, não coradas.

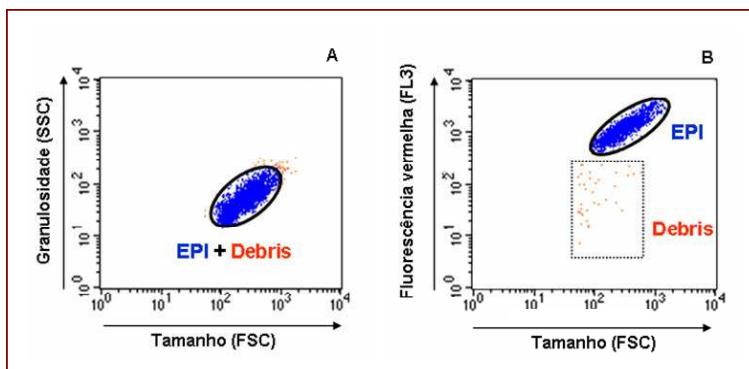


Figura 9 – 'Dots plots' mostrando a seleção da população de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em gráficos de tamanho (FSC) 'versus' granulosidade (SSC) na FC-AFEA-IgG original (A) e tamanho (FSC) 'versus' fluorescência 3 (FL3) na FC-AFEA-IgG modificada (B). Em A, a elipse de cor preta delimita a população de epimastigotas (azul) não separada dos 'debris'; em B, a elipse preta delimita apenas a população de epimastigotas. O retângulo pontilhado delimita os 'debris' (vermelho).

Paralelo ao aumento da reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi*, pelos fatores descritos anteriormente, observamos que, com a introdução do corante azul de Evans na FC-AFEA-IgG modificada, houve ganho relacionado com maior homogeneidade na seleção da população de interesse, mas também redução na intensidade média da fluorescência 1 (FL1) do anticorpo secundário (conjugado), fenômeno denominado 'quenching' (figura 10). Não surpreendente foi a observação de que esse fenômeno também teve impacto no perfil de intensidade de fluorescência 1 (FL1) das amostras-teste de indivíduos não infectados e pacientes chagásicos. Porém, esta alteração na intensidade de fluorescência no grupo de pacientes chagásicos não foi significativa, uma vez que houve apenas 1% de redução da intensidade de fluorescência relativa. O mesmo não é observado para os grupos clínicos não-infectados e no tubo controle do conjugado, nos quais houveram redução de intensidade de fluorescência relativa. Esta alteração pode ser mais significativa em amostras com reatividade muito baixa, cujos picos estejam próximos ao limiar de reatividade estabelecido pelo controle do conjugado.

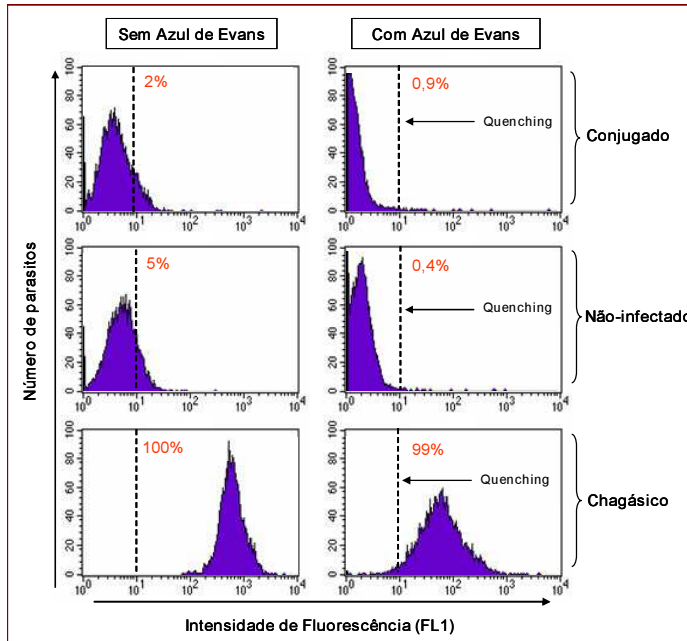


Figura 10 - Histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência (FL1) em função do número de parasitos de amostras: controle do conjugado, indivíduo não-infectado e paciente chagásico sem ou com marcação dos parasitos com azul de Evans. A linha pontilhada indica o limiar de reatividade estabelecido pelo controle do conjugado.

Utilizando a nova estratégia para seleção da população de epimastigotas, interessante, pudemos observar que apesar do efeito 'quenching', a técnica FC-AFEA-IgG modificada apresentou reatividade superior, quando comparada com a técnica FC-AFEA-IgG modificada sem a utilização do azul de Evans para marcação dos parasitos (figura 11).

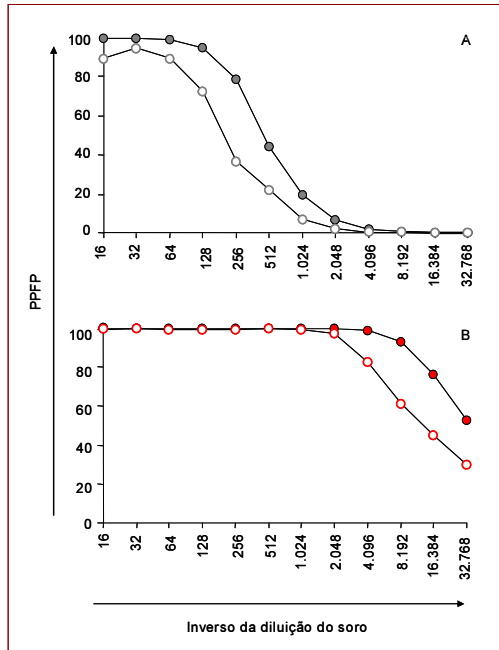


Figura 11 - Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) 'pool' de soros de indivíduos não infectados (NI) e (B) 'pool' de soros de pacientes chagásicos (CH). As amostras de 'pool' de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada 'pool' está expresso em valores de PPFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16. As curvas de titulação de maior reatividade representam a FC-AFEA-IgG modificada (NI = ● e CH = ●) e as curvas de titulação com menor reatividade (NI = ○ e CH = ○) representam a FC-AFEA-IgG original. Foram usados anticorpos de revelação (conjugados com FITC) de diferentes fabricantes – SIGMA® (NI = ● e CH = ●) e BIOLAB® (NI = ○ e CH = ○) na diluição de 1:800.

5.2 Estabelecimento dos critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada isoladamente no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas

5.2.1 Determinação da diluição empregada na FC-AFEA-IgG modificada aplicada ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas

A figura 12 mostra os resultados da análise da reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi*, presente em soros de indivíduos não-infectados e pacientes chagásicos, empregando as alterações

previamente estabelecidas (FC-AFEA-IgG modificada). A reatividade foi expressa como PFP. Observamos que os valores de PFP das curvas de titulação de IgG para os indivíduos NI e pacientes CH apresentaram perfis claramente distintos.

Após a obtenção dos valores de PFP da FC-AFEA-IgG modificada, na faixa de diluição do soro de 1:16 até 1:32.768, o próximo passo foi avaliar o desempenho da nova metodologia aplicada ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Para tal, foram construídas as Curvas ROC e calculados os índices de avaliação de desempenho, expressos em porcentagem, conforme descrito em Materiais e Métodos.

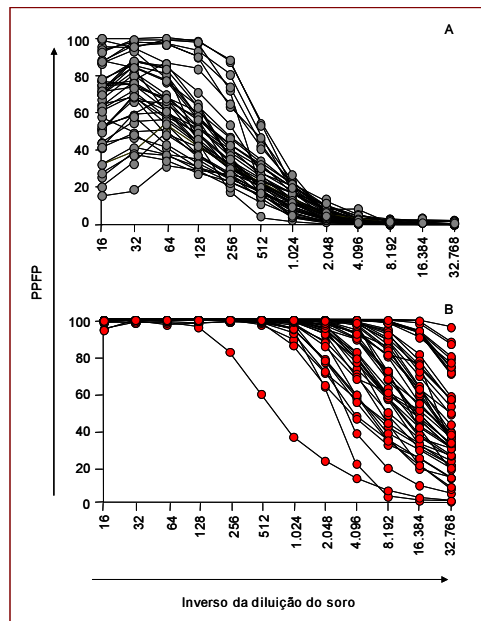


Figura 12 - Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) soros de indivíduos não infectados (NI = ●) e (B) pacientes chagásicos (CH = ●). As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.

Observou-se um excelente desempenho da FC-AFEA-IgG modificada da diluição 1:512 até a diluição 1:8.192 (destacadas pela linha vermelha), apresentando valores de sensibilidade e especificidade de 100% e acurácia (ASC) de 1,0 (figura 13). Conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 1,0 indica uma elevada acurácia do método.

Uma vez que obteve-se, pela análise da curva ROC, cinco diluições (1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192) com excelente desempenho, utilizamos uma outra estratégia para ajudar a selecionar a(s) melhor(es) diluição(ões) a ser(em) empregada(s) na FC-AFEA-IgG modificada aplicada para fins de diagnóstico. Neste contexto, verificamos através das curvas de reatividade média de PFP, qual diluição apresentaria maior amplitude de segregação entre os grupos NI e CH.



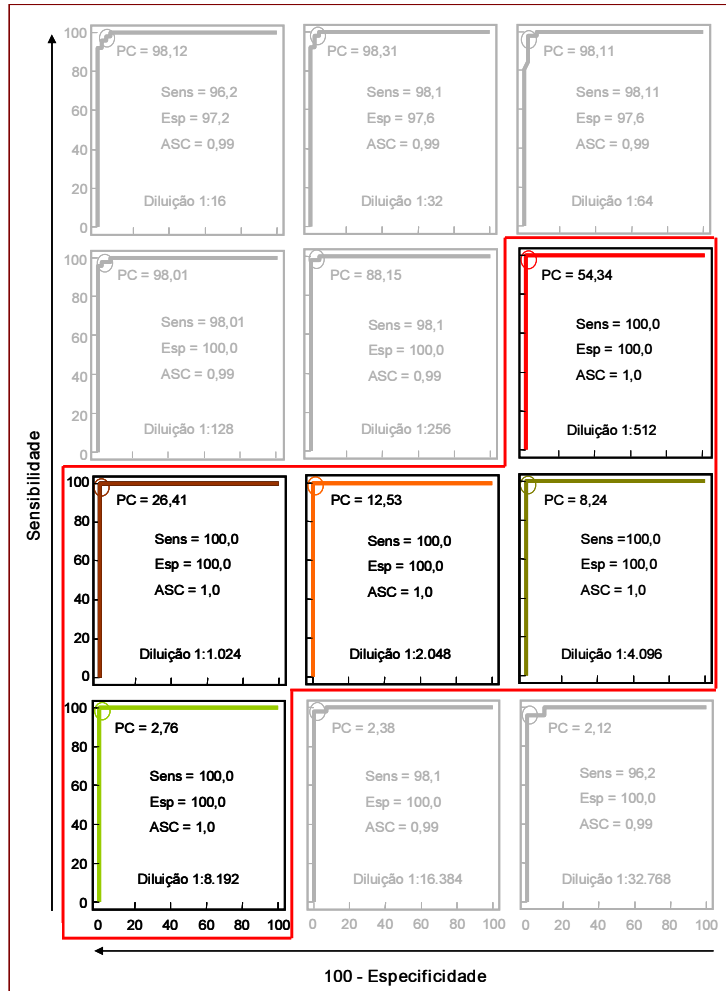


Figura 13 - Curvas ROC da FC-AFEA-IgG modificada construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade, dos grupos NI e CH nas diluições 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192, 1:16.384 e 1:32.768. Os resultados estão expressos, pelos pontos dos gráficos, que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC representam o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a FC-AFEA-IgG. A linha vermelha seleciona as diluições que obtiveram os melhores índices de desempenho, onde: Sens = sensibilidade; Esp = especificidade; PC = ponto de corte.

A figura 14 mostra que, dentre as cinco diluições anteriormente selecionadas, as diluições de soro 1:1.024, 1:2.048 e 1:4.096, foram aquelas que melhor segregaram os grupos, apresentando valores de  $\Delta$  PFP (valor de PFP do grupo CH – valor de PFP do grupo NI) acima de 80%, sendo estes 84,1%; 86,5% e 80,5%, respectivamente.

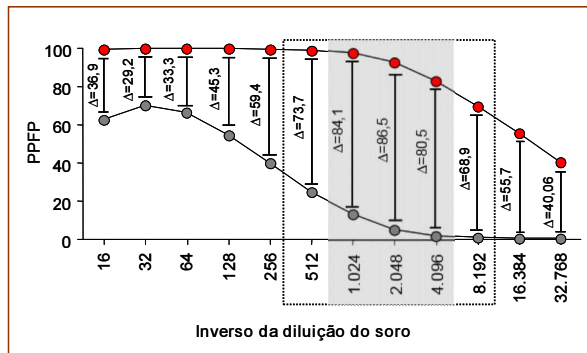


Figura 14 – Curvas de titulação das reatividades médias dos grupos NI (●) e CH (●). O quadrado pontilhado indica as diluições-candidatas selecionadas de acordo com parâmetros relacionados com índices de desempenho na figura 13. O quadrado cinza seleciona as diluições que tiveram valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) acima de 80%: 1:1.024, 1:2.048 e 4.096. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.

A figura 15 mostra os gráficos de dispersão das diluições selecionadas, onde observou-se que todas as três diluições-candidatas apresentaram bom desempenho na segregação entre os grupos, quando considerados os diferentes pontos de corte sugeridos pela análise estatística da curva ROC. Em princípio, foram escolhidas essas três diluições como candidatas para a utilização no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

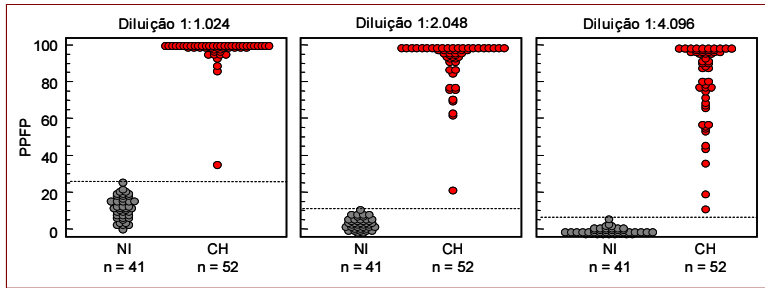


Figura 15 – Análise da reatividade das diluições-candidatas (selecionadas por índices de desempenho + valores de  $\Delta$  de PPFP maiores que 80%) dos grupos NI (●) e CH (●) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de cortes sugeridos pela curva ROC. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PPFP.

### 5.2.2 Determinação da diluição empregada na FC-AFEA-IgG modificada aplicada à monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

Tem sido sugerido que a diminuição dos títulos de anticorpos anti-T. cruzi no soro de pacientes chagásicos após o tratamento pode ser um método alternativo de monitoração de cura pós-terapêutica. Por sua vez, a permanência de anticorpos anti-T. cruzi poderia indicar a persistência do parasito e ser um fator preditivo para recidiva da doença de Chagas.

Empregando a FC-AFEA-IgG modificada avaliamos a reatividade de IgG total anti-formas epimastigotas fixadas de T. cruzi em soros de pacientes chagásicos submetidos ao tratamento etiológico. Essa análise foi realizada utilizando-se diluições seriadas (1:16 a 1:32.768) de amostras de soro de pacientes tratados curados (TC) e pacientes tratados não-curados (TNC). A revelação da ligação de anticorpos IgG a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos policlonais anti-Fc de IgG humano conjugados com FITC.

A figura 16 mostra os resultados da reatividade de soros de indivíduos tratados curados (A) e tratados não-curados (B) em valores de PPFP. Observamos um perfil diferente da curva de titulação de IgG entre os grupos.

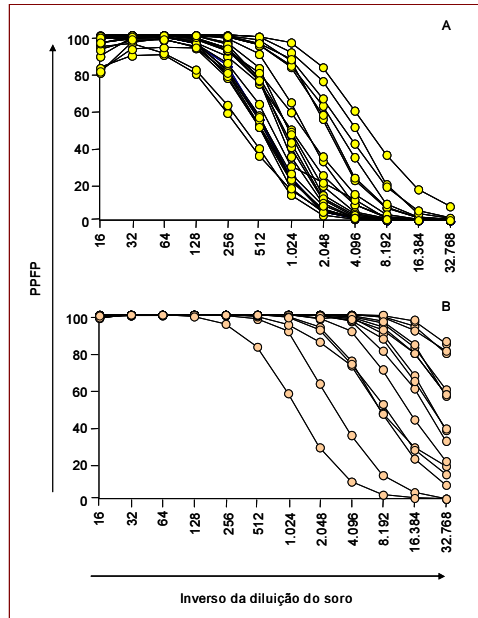


Figura 16 – Curvas de titulação de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* presentes em (A) soros de pacientes chagásicos tratados curados (TC = ●) e (B) soros de pacientes chagásicos tratados não-curados (TNC = ○). As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.

Após a obtenção dos valores de PFPF da FC-AFEA-IgG modificada, na faixa de diluição do soro de 1:16 até 1:32.768, o próximo passo foi avaliar o desempenho da metodologia aplicada à monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas. Para tal, foram construídas as curvas ROC e calculados os índices de avaliação de desempenho, expressos em porcentagem, conforme descrito em Materiais e Métodos (figura 17).

Observou-se um excelente desempenho da FC-AFEA-IgG modificada da diluição 1:1024 até a diluição 1:8192 (destacadas pela linha vermelha), apresentando valores de sensibilidade e especificidade de 100% e acurácia (ASC) de 1,0. Conforme a classificação sugerida por Swets (1988), o valor de ASC de 1,0 indica uma elevada acurácia do método.

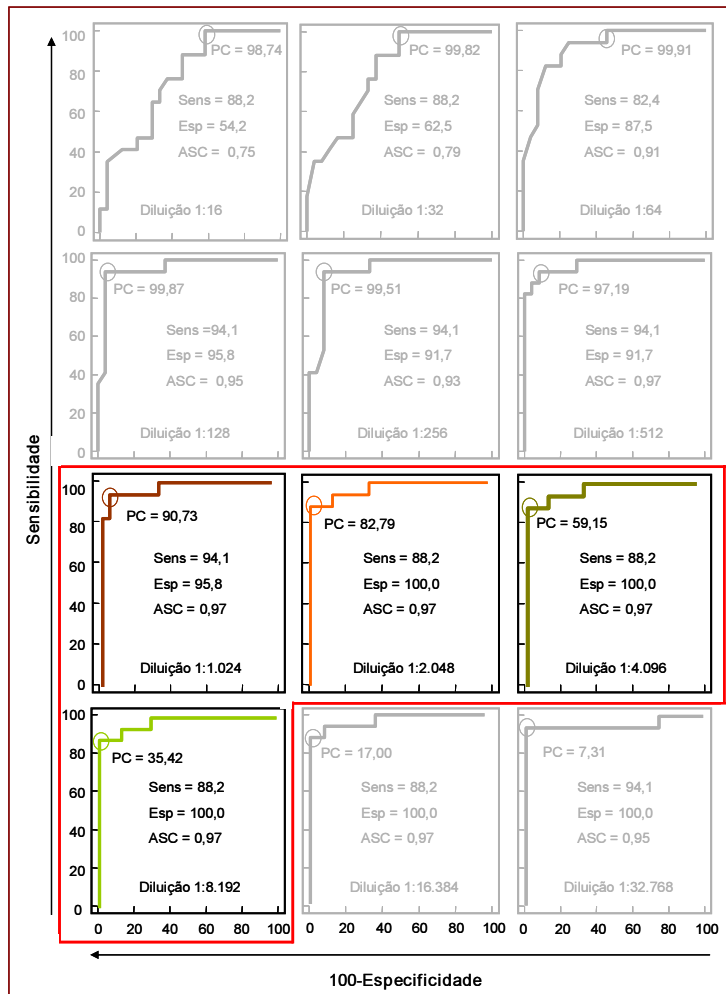


Figura 17 - Curvas ROC de FC-AFEA-IgG modificada construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade, dos grupos TC e TNC nas diluições 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192, 1:16.384 e 1:32.768. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim a área sob a curva (ASC). Os círculos coloridos dentro das curvas ROC representam o melhor ponto de corte sugerido pela curva para a FC-AFEA-IgG. A linha vermelha seleciona as diluições que obtiveram os melhores índices de desempenho, onde: Sens = sensibilidade; Esp = especificidade; PC = ponto de corte.

Uma vez que foi obtido, pela análise da curva ROC, quatro diluições com excelente desempenho (1:1.024, 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192), utilizou-se uma outra estratégia para selecionar a(s) melhor(es) diluição(ões) a ser(em) empregada(s) na FC-AFEA-IgG modificada aplicada para fins de monitoração de cura pós-terapêutica. Contudo, foi verificado através das curvas de reatividade média de PFP, qual diluição apresentaria maior amplitude de segregação ( $\Delta$  PFP) entre os grupos TC e TNC. A figura 18 mostra que as diluições do soro 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192, foram aquelas que melhor segregaram os grupos, apresentando valores de  $\Delta$  PFP acima de 60%, sendo eles, 65,77%; 72,66% e 69,75%, respectivamente.

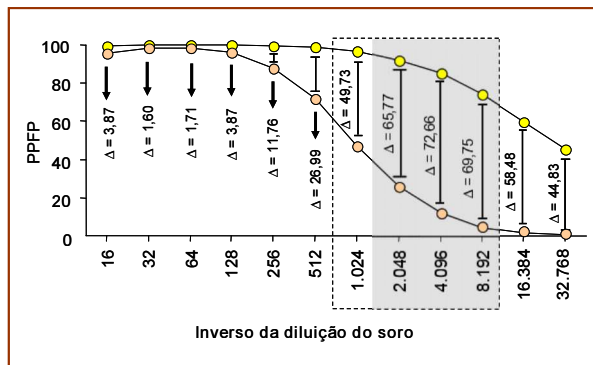


Figura 18 – Curvas de titulação das reatividades médias dos grupos TC (●) e TNC (○). O retângulo pontilhado indica as diluições-candidatas selecionadas de acordo com parâmetros relacionados aos valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) que melhor segregaram os grupos TC e TNC. O quadrado cinza seleciona as diluições que tiveram valores de amplitude de PFP ( $\Delta$ ) acima de 60%: 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP. A diluição inicial testada para ambos os grupos foi de 1:16.

Adicionalmente, analisamos os perfis de dispersão das amostras individuais de pacientes TC e TNC, nas três diluições selecionadas na figura 18, com o objetivo de avaliar o seu desempenho na segregação entre os grupos. A figura 19 mostra os gráficos de dispersão das diluições selecionadas, onde observa-se que todas as três diluições-candidatas apresentam bom desempenho na segregação entre os grupos, quando considerados os diferentes pontos de cortes sugeridos pela análise

estatística da curva ROC. Em princípio, foram selecionadas três diluições como candidatas para a utilização na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

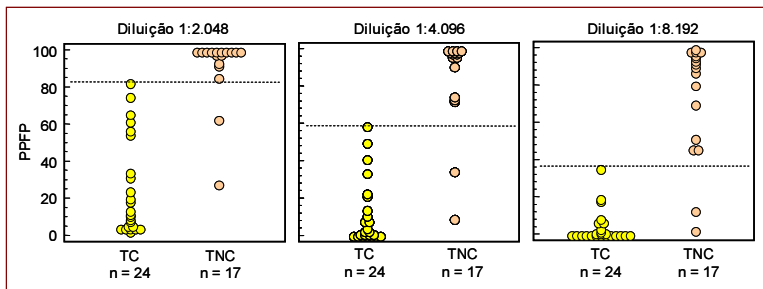


Figura 19 - Análise da reatividade das diluições candidatas dos grupos TC (●) e TNC (○) através do perfil de dispersão individual em diferentes pontos de cortes sugeridos pela curva ROC. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF.

### 5.3. Unificação dos critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada aplicada simultaneamente no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas

No estudo realizado por Vitelli-Avelar e colaboradores (2007), foram eleitas duas diluições para interpretação dos resultados da FC-AFEA-IgG original aplicada ao diagnóstico (1:1.024) e à monitoração de cura pós-terapêutica (1:2.048). Neste contexto, na FC-AFEA-IgG modificada nosso próximo objetivo foi escolher uma diluição consenso aplicável às duas situações clínicas: diagnóstico sorológico da doença de Chagas e à monitoração de cura pós-terapêutica de pacientes chagásicos.

Segundo os critérios sugeridos pela análise estatística através da curva ROC e seus respectivos gráficos de dispersão, constata-se que, quando comparadas as diluições-candidatas obtidas na análise de diagnóstico dos grupos de indivíduos não-infectados e pacientes chagásicos, e de monitoração de cura pós-terapêutica dos grupos de pacientes chagásicos tratados-curados e tratados não-curados, duas diluições, 1:2.048

e 1:4.096, foram compartilhadas por ambos os grupos, como demonstrado na figura 20. Assim, o próximo objetivo foi realizar uma análise do desempenho da FC-AFEA-IgG modificada, nessas duas diluições, através de índices expressos em percentual e em chances, para unificação da diluição empregada na nova metodologia.

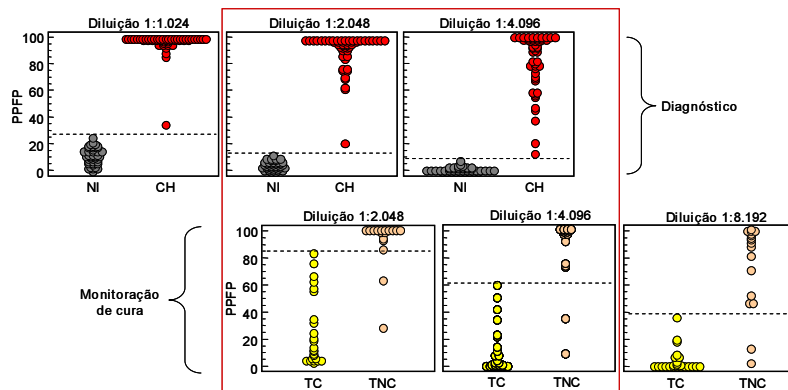


Figura 20 - Gráficos de dispersão das diluições-candidatas que apresentam a melhor segregação entre os grupos NI (●) e CH (●), no âmbito do diagnóstico e TC (●) e TNC (○), no âmbito da monitoração de cura pós-terapêutica. A linha vermelha acima seleciona as diluições compartilhadas por ambos os grupos. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF.

### 5.3.1 Avaliação do desempenho da FC-AFEA-IgG modificada na diluição 1:2.048 e 1:4.096 para determinação da diluição consenso

Foi analisado o desempenho da FC-AFEA-IgG modificada através de índices expressos em percentual e em chances, nas diluições-candidatas (compartilhadas) a serem empregadas tanto no diagnóstico quanto no critério de cura da doença de Chagas. Nessa análise, a população foi constituída pelo somatório de grupos com perfis semelhantes de reatividade sorológica: NI + TC e CH + TNC.

Foram construídas as curvas ROC e calculados os índices de avaliação de desempenho, expressos em porcentagem e em chances, nas diluições 1:2.048 e 1:4.096 (figura 21).



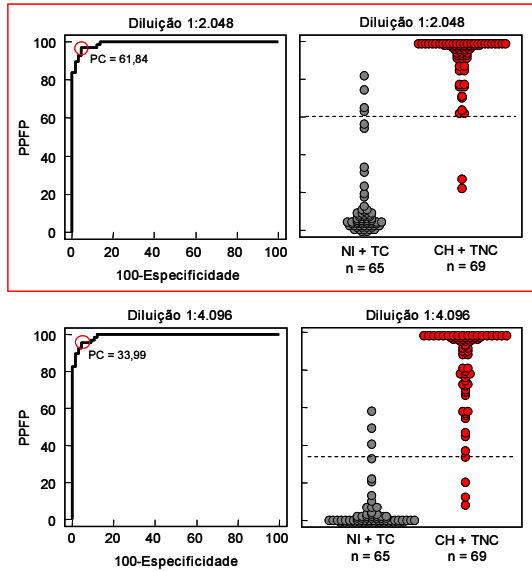


Figura 21 – Análise do desempenho, nas diluições compartilhadas, em população constituída pelo somatório de grupos com perfil semelhante de reatividade sorológica (NI +TC = ● e CH + TNC = ●). A linha vermelha acima seleciona a diluição que, além de apresentar os melhores índices de desempenho, segrega de forma mais homogênea a população de estudo. As amostras individuais de soros foram testadas através do procedimento descrito em Materiais e Métodos. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFPF. PC = ponto de corte.

Observou-se que a diluição 1:2.048 apresentou melhores índices de desempenho quando comparados com a diluição 1:4.086 no que diz respeito à sensibilidade (97,01% x 95,07%), valor preditivo negativo (96,9% x 95,7%), Razão de Verossimilhança Positivo (21,04 x 20,72) e índice “J” de Youden (91,8 x 89,0). Com relação à análise dos índices expressos em porcentagem, o VPP de 95,7%, praticamente confirma a presença da doença e o VPN de 95,4% praticamente confirma a ausência de doença (Tabela 3). Deve-se ressaltar que os valores preditivos podem variar de acordo com a prevalência da doença, diferentemente da sensibilidade e especificidade, que serão os mesmos em diferentes prevalências, indicando características intrínsecas da metodologia.

TABELA 3 – ÍNDICES DE DESEMPENHO, EM DIFERENTES DILUIÇÕES, DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi*.

Índices	Diluição 1:2.048*	Diluição 1:4.096**	Ganho
Sensibilidade	97,01%	95,07%	1,94%
Especificidade	95,4%	95,4%	0%
Valor Preditivo Positivo	95,7%	95,7%	0%
Valor Preditivo Negativo	96,9%	95,4%	1,5%
Razão de Verossimilhança Positiva	21,04	20,72	0,32
Razão de Verossimilhança Negativa	0,03	0,05	0
Acurácia global	0,99%	0,99%	0%
“J” de Youden	91,0%	89,0%	2%

\* Ponto de corte de 61,84%; \*\* Ponto de corte de 33,99%.

Portanto, diante desses dados, selecionou-se a diluição 1:2048 e o respectivo ponto de corte indicado pela curva ROC (60%), como diluição a ser empregada na FC-AFEA-IgG modificada aplicável tanto ao diagnóstico quanto à monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

Para a confirmação do desempenho da diluição escolhida e do ponto de corte ideal para as análises, foi utilizada outra ferramenta estatística: a ‘Two-Graph Roc Curve Analysis’ (TG-ROC). Segundo os índices de desempenho fornecidos pela TG-ROC, quando analisada a população constituída pelo somatório de grupos com perfil semelhante de reatividade sorológica, houve uma confirmação de que o ponto de corte ideal está na faixa aproximada de 60% (figura 22).

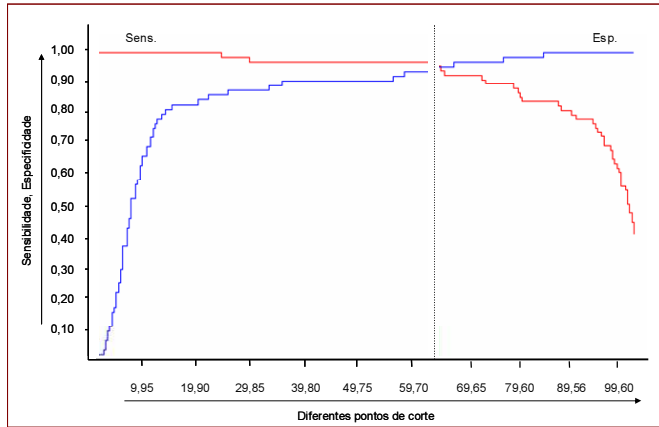


Figura 22 – Análise do desempenho TG-ROC na diluição selecionada (1:2.048) em população constituída pelo somatório de grupos com perfil semelhante de reatividade sorológica (NI + TC e CH + TNC) para definição do ponto de corte. As linhas vermelha e azul representam, respectivamente, os índices de sensibilidade e especificidade da metodologia. Sens.= sensibilidade; Esp.= especificidade.

A figura 23 mostra que a faixa que vai de 55% a 70% compreenderia valores de pontos de cortes nos quais o teste seria considerado válido. Ainda nesta figura, pode ser observado que reatividades acima de 89% apresentam Razão de Verossimilhança Positiva tendendo para o infinito, ou seja, praticamente confirmando advir de um paciente chagásico ou tratado não curado e que reatividades abaixo de 28% apresentariam Razão de Verossimilhança Negativa tendendo para o infinito, praticamente confirmando advir de um indivíduo não infectado ou de um paciente chagásico tratado curado.

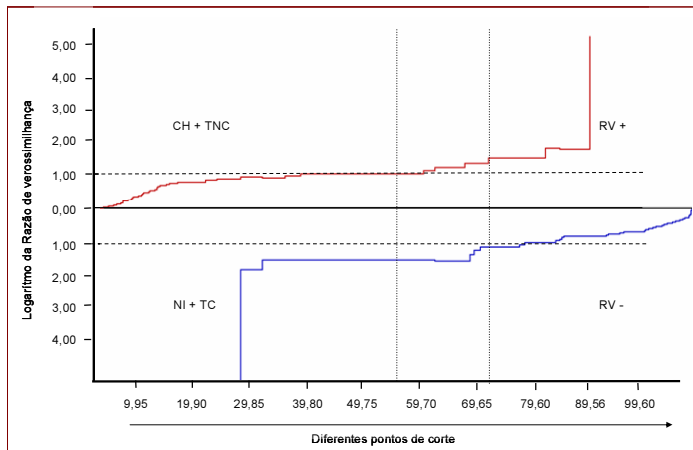


Figura 23 – Determinação da amplitude do ponto de corte de trabalho da técnica FC-AFEA-IgG modificada pela análise da Razão de Verossimilhança fornecida pela TG-ROC. As linhas vermelha e azul indicam, respectivamente, as Razões de Verossimilhança Positiva do grupo CH + TNC e Negativa do grupo NI + TC. RV+ = Razão de Verossimilhança Positiva; RV- = Razão de Verossimilhança Negativa.

#### 5.4 Avaliação da aplicabilidade da FC-AFEA-IgG modificada na segregação sorológica de pacientes chagásicos e de indivíduos não-chagásicos portadores de outras doenças infecto-parasitárias de interesse médico

A reatividade de IgG anti-T. cruzi foi obtida após incubação do soro humano diluído 1:16 a 1:32.768, com formas epimastigotas fixadas, de 10 dias de cultivo, nas condições previamente padronizadas. A revelação da ligação de IgG total a determinantes antigênicos do parasito foi realizada pela utilização de anticorpos policlonais anti-porção Fc de IgG humano conjugados com FITC (SIGMA®). Empregando-se um ponto de corte de PFP = 60%, na diluição 1:2048, os resultados foram classificados como positivos quando PFP > 60% e negativos quando PFP ≤ 60%.

O estudo de amostras individuais demonstrou que a FC-AFEA-IgG modificada tem valor na discriminação sorológica de pacientes chagásicos e não-chagásicos, este constituindo o grupo formado pelos pacientes

portadores de todas as outras doenças infecto-parasitárias descritas acima. A técnica permitiu identificar 98,1% dos pacientes CH com valores confinados numa região de resultados positivos e 93,2% dos pacientes NCH com valores de PFP restritos a uma região de resultados negativos (figura 24). Observou-se que onze pacientes do grupo NCH (6,8%) apresentaram um perfil de reatividade acima do ponto de corte (60%), representando os resultados falso-positivos.

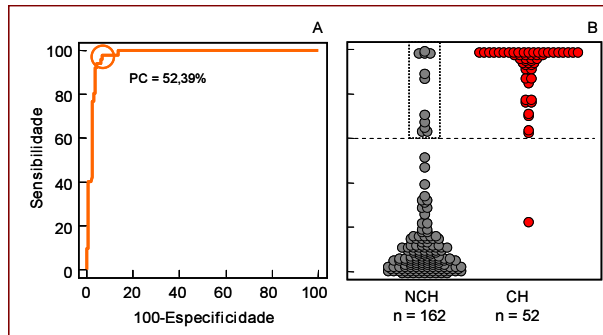


Figura 24 – (A) curva ROC da FC-AFEA-IgG modificada numa amostragem populacional que inclui soros de indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos, construída a partir dos índices de desempenho, sensibilidade e 100 - especificidade. Os resultados estão expressos pelos pontos dos gráficos que representam os valores dos referidos índices avaliados, determinando assim, a área sobre a curva (ASC) para a FC-AFEA-IgG na diluição 1:2.048. (B) Reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos não chagásicos (NCH = ●) e pacientes chagásicos (CH = ●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP > 60%) e negativos (PFP ≤ 60%). O retângulo pontilhado representa os resultados falso-positivos.

Além dos índices de sensibilidade e especificidade, destaca-se ainda a elevada acurácia do método, com valor de 0,97. A Razão de Verossimilhança (RV) para o resultado positivo da FC-AFEA-IgG modificada (PFP > 60%) foi 14,44 e para o resultado negativo (PFP ≤ 60%) foi 0,02. Este dado significa que o valor de PFP > 60% é cerca de quatorze vezes mais provável de ser observado em um paciente chagásico (CH) em relação a um paciente não chagásico (NCH). Por outro lado, valores iguais ou inferiores a 60% de PFP apresentam uma chance mínima, 0,02 vezes de advir de um paciente chagásico. Essas análises em conjunto confirmaram o desempenho satisfatório da FC-AFEA-IgG modificada (Tabela 4).

TABELA 4 – ÍNDICES DE DESEMPENHO DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA DILUIÇÃO 1:2.048 PARA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi*.

Índices	Diluição 1:2.048*
Sensibilidade	98,01% (IC** = 89,7 - 99,7)
Especificidade	93,2% (IC** = 88,2 - 96,6)
Valor Preditivo Positivo	82,3%
Valor Preditivo Negativo	99,3%
Razão de Verossimilhança Positiva	14,44%
Razão de Verossimilhança Negativa	0,02%
Acurácia global	0,97%
"J" de Youden	81,6%

\*Ponto de corte = 52,39%; \*\*IC = Intervalo de confiança de 95%.

Na análise do perfil da curva de titulação (figura 25), empregando os mesmos critérios mencionados anteriormente, verificou-se que a reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* na diluição de 1:2.048, ponto de corte de 60% de PFP, o grupo de indivíduos não-chagásicos (figura 25A), apresentou um número maior de indivíduos com valores de PFP abaixo de 60%. Já o grupo dos pacientes chagásicos (figura 25B) apresentou resultados altamente reativos, com exceção de apenas um paciente, que apresentou valores de PFP abaixo do ponto de corte.

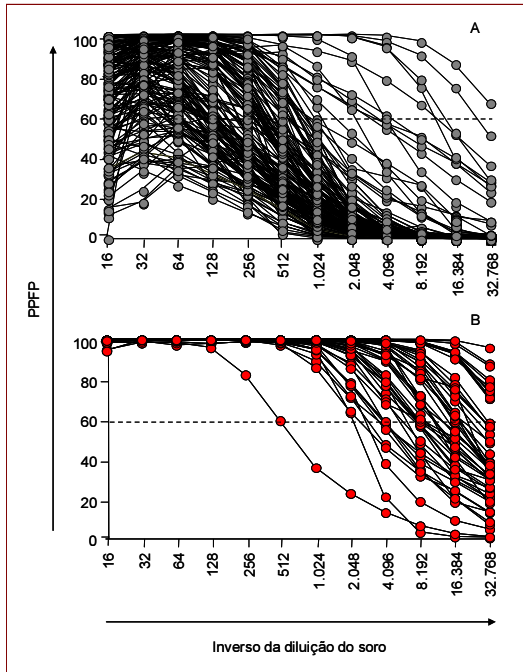


Figura 25 – Curvas de titulação de reatividade IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em (A) soros de indivíduos não-chagásicos (NCH = ●) e (B) soro de pacientes chagásicos (CH = ●). O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso em valores de PPFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP > 60%) e negativos (PPFP ≤ 60%).

A análise das curvas de titulação das amostras individuais de pacientes não-chagásicos (figura 26) permite confirmar um perfil de reatividade diversa, sendo que, de acordo com a literatura (Chiller et al. 1990, Kar 1995, Vexenat et al. 1996), as leishmanioses ainda representam o grupo de doenças parasitárias que mais apresentam reações cruzadas com doença de Chagas.

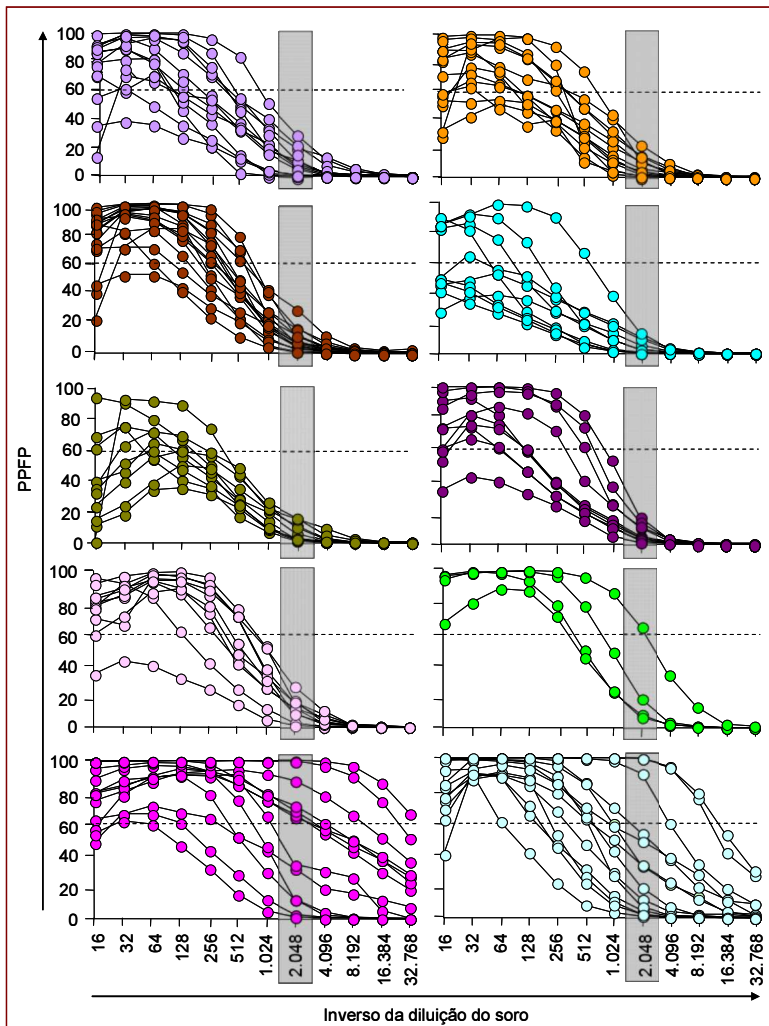


Figura 26 – Curvas de titulação de reatividade IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos portadores de outras doenças parasitárias: esquistossomose mansônica (○), malária (●), toxoplasmose (●), HTLV (●), HIV (●), hepatite B (●), hepatite C (○), sífilis (●), leishmaniose visceral (●) e leishmaniose tegumentar (○) na diluição do soro 1:2.048, destacada pelo retângulo cinza. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PPFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PPFP > 60%) e valores negativos (PPFP ≤ 60%).



A análise em conjunto do perfil de reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* das amostras de soro de indivíduos não-infectados, pacientes chagásicos e indivíduos não-chagásicos, demonstrou a distribuição das amostras, na diluição 1:2.048, em função do ponto de corte de 60% de PFP (figura 27). Identificou-se a contribuição de cada doença, em número absoluto, para o percentual de resultados falso-positivos (sífilis = 1; leishmaniose visceral = 7; leishmaniose tegumentar = 3).

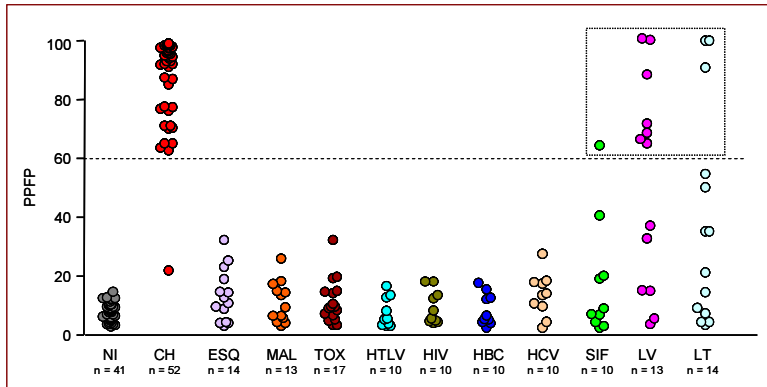


Figura 27 – Análise da reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *Trypanosoma cruzi* em soros de indivíduos não infectados (NI = ●), chagásicos (CH = ●) e portadores de outras doenças infecto-parasitárias: esquistossomose mansônica (ESQ = ○), malária (MAL = ●), toxoplasmose (TOX = ●), indivíduos infectados pelo HTLV (HTLV = ●), indivíduos infectados pelo HIV (HIV = ●), hepatite B (HBC = ●), hepatite C (HCV = ○), sífilis (SIF = ●), leishmaniose visceral (LV = ●) e leishmaniose tegumentar (LT = ○), na diluição do soro 1:2.048. O resultado da reatividade de IgG para cada amostra individual está expresso como valores de PFP, empregando-se como ponto de corte o valor de 60% (linha pontilhada) entre resultados positivos (PFP > 60%) e valores negativos (PFP ≤ 60%). O quadrado pontilhado indica os resultados falso-positivos.

Através da análise comparativa dos índices de desempenho de cada doença relacionada na figura 27, foi possível a análise detalhada de cada grupo clínico estudado com relação à doença de Chagas. Nesse sentido, a tabela 5 mostra um panorama geral desses índices, permitindo identificar um percentual de apenas 6,8% de resultados falso-positivos, em uma amostra populacional que inclui soros de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias (não-chagásicos), e apenas 1,9% de resultados falso-negativos, em uma amostra populacional que inclui pacientes chagásicos não-tratados, demonstrou a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG modificada no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

TABELA 5 – ÍNDICES DE DESEMPENHO DA FC-AFEA-IgG MODIFICADA NA DILUIÇÃO 1:2.048, PARA AVALIAÇÃO DE UMA AMOSTRA POPULACIONAL QUE INCLUI PACIENTES PORTADORES DE OUTRAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS.

Índices	CH	ESQ	MAL	TOX	HTLV	HIV	HBV	HCV	SIF	LV	LT
SENS	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*	98,1 (89,7-99,7)*
ESP	100 (91,3-100)*	100 (76,7-100)*	100 (75,1-100)*	100 (80,3-100)*	100 (69-100)*	100 (69-100)*	100 (69-100)*	100 (69-100)*	90 (55,5-98,3)*	46,2 (19,3-74,8)*	78,6 (49,2-95,1)*
VPP	100	100	100	100	100	100	100	100	98,1	87,9	94,4
VPN	97,6	93,3	92,9	94,4	90,9	90,9	90,9	90,9	90	85,7	91,7
RV+	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	9,81	1,82	4,58
RV-	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02
ASC	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,84	0,89
"J" de Youden	98%	93%	92%	94%	90%	90%	90%	90%	88%	73%	86%

\*Intervalo de confiança = 95%, ponto de corte = 60%.

---

## 6 DISCUSSÃO

A infecção pelo *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune promovendo, além da imunidade celular, uma intensa resposta humoral. Dentre os aspectos abordados nos estudos mais recentes sobre a avaliação de parâmetros imunológicos na doença de Chagas, destacam-se trabalhos que visam compreender os mecanismos envolvidos nos eventos de resistência e/ou patogenia, bem como aqueles que focalizam a busca de novos métodos diagnósticos e de monitoração de cura pós-terapêutica da infecção crônica pelo *T. cruzi* (Britto et al. 1999, Gomes 1997, Gomes et al. 1999, Umezawa et al. 1999). Nesse contexto, o estabelecimento de metodologias de avaliação da produção de anticorpos específicos que visem maior especificidade e sensibilidade, representam o principal foco de muitas investigações, sendo portanto objeto de estudo do nosso trabalho.

O diagnóstico sorológico da fase crônica da doença de Chagas, baseia-se principalmente na avaliação da resposta imune humoral pela identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* através de diferentes técnicas como IFI, HAI e ELISA. Devido ao compartilhamento antigênico, sobretudo entre parasitos da mesma família, como é o caso dos tripanossomatídeos (gêneros: *Trypanosoma* e *Leishmania*), estes métodos sorológicos apresentam especificidade variada, com um número considerável de resultados falso-positivos (Vexenat et al. 1996). Este fato constitui uma limitação, uma vez que em inquéritos epidemiológicos abrangendo área endêmica, co-existirão indivíduos infectados por outras doenças infecto-parasitárias. Outra limitação relaciona-se à obtenção de resultados contraditórios provenientes de diferentes laboratórios. Dessa forma, o Ministério da Saúde (MS), preconiza que o diagnóstico sorológico confiável para esta enfermidade deve ser fundamentado em resultados obtidos por duas técnicas sorológicas que possuam princípios distintos ou que utilizem preparações antigênicas diferentes (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005).

No âmbito da monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, até o momento, o critério adotado para o estabelecimento da eficácia terapêutica baseia-se na avaliação de aspectos laboratoriais, ou seja, a negatificação dos exames parasitológicos e sorológicos convencionais e não-convencionais. Desta forma, um dos desafios atuais relacionados ao diagnóstico e à monitoração de cura pós-terapêutica é a falta de abordagens laboratoriais confiáveis a serem usadas como ferramentas para a elucidação dessas questões (Galvão et al. 1993). Vale ressaltar que os métodos parasitológicos rotineiramente utilizados para ambas situações apresentam baixa sensibilidade, dado a diminuição da parasitemia, vigente na fase crônica da doença.

A utilização de métodos sorológicos, tais como HAI, RIFI, ELISA, e 'Imunoblotting' na imunossorologia, com eventual ênfase no diagnóstico da doença de Chagas, tem sido objeto de estudo de vários trabalhos (Peralta et al. 1994, Picka et al. 2007; Tobler et al. 2007, Umezawa et al. 1999; Zarate-Blades et al. 2007). Diversos estudos têm sugerido, como preconizado pelo MS, a utilização de dois métodos sorológicos visando o diagnóstico etiológico da infecção chagásica (Berrizbeitia 2006, Gadelha et al. 2003). Entretanto, mesmo utilizando essas abordagens, resultados inconclusivos são observados, implicando na repetição dos exames e, indiretamente, em gastos resultantes das etapas de retestagens.

Além dos testes convencionais, outros métodos têm sido desenvolvidos para avaliar o processo de cura da doença de Chagas. Neste sentido, vários pesquisadores passaram a utilizar antígenos recombinantes nos testes de ELISA e Western blot (Krautz et al. 1994, Meira et al. 2004, Nakazawa et al. 2001). Nestas últimas décadas, técnicas sorológicas usando antígenos excretados/secretados, purificados e ou recombinantes e moleculares têm sido empregadas com potencial em predizer a cura em pacientes chagásicos crônicos (Almeida et al. 1991, Guevara et al. 1995, Norris et al. 1994).

Em relação aos testes da sorologia convencional, apesar de extremamente eficientes para o diagnóstico da infecção chagásica, eles não colaboram como parâmetros de cura precoce, uma vez que a ausência dos anticorpos detectados pela sorologia convencional após a eliminação do parasito é lenta e gradual, persistindo por vários anos, mesmo na ausência do parasito (Galvão et al. 1993, Krettli et al. 1984, Luquetti & Rassi 2000).

Na busca de novas perspectivas para abordagens imunossorológicas no estudo da monitoração clínico-terapêutica em doenças infecto-parasitárias, o grupo de pesquisa do LBDM vem desde 1995 procurando identificar preparações antigênicas, bem como protocolos experimentais que permitam o estabelecimento de metodologias alternativas para utilização em estudos clínicos. Em 1995, Martins-Filho e colaboradores, desenvolveram uma metodologia baseada na citometria de fluxo para a detecção de anticorpos anti-tripomastigotas vivas do *T. cruzi* e demonstrou sua utilização na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas. Entretanto, apesar do bom desempenho, houveram algumas limitações metodológicas relacionadas à obtenção das formas tripomastigotas utilizadas como antígeno, ao caráter lábil da preparação antigênica e ao risco inerente à manipulação de formas infectantes do parasito.

Dessa forma, nosso desafio tecnológico foi adaptar a metodologia para a pesquisa de anticorpos anti-formas epimastigotas de *T. cruzi* pré-fixadas em paraformaldeído. Recentemente, Vitelli-Avelar e colaboradores (2007) demonstraram a aplicabilidade da pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi*, detectados por citometria de fluxo (FC-AFEA-IgG), no diagnóstico sorológico (sensibilidade = 82% e especificidade = 100%) e monitoração de cura pós-terapêutica (sensibilidade e especificidade de 100%) da doença de Chagas.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, considerando-se a aplicabilidade da metodologia proposta, o presente trabalho buscou a otimização dessa metodologia, focalizando o diagnóstico da infecção crônica pelo *T. cruzi*, uma vez que, os índices de desempenho da FC-AFEA-IgG,

para fins de diagnóstico, foram considerados moderados, dada a baixa sensibilidade, baixo valor preditivo positivo e não apresentando valor diagnóstico baseado nos índices de desempenho expressos em chance.

A primeira etapa do presente trabalho consistiu na otimização da FC-AFEA-IgG aplicada ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas, através de alterações intrínsecas da metodologia. Quatro pontos principais foram trabalhados: (1) natureza molecular do anticorpo secundário; (2) faixa de diluição das amostras-teste; (3) eliminação da interferência de partículas não-relacionadas durante a seleção de formas epimastigotas de *T. cruzi* e (4) a unificação da diluição a ser empregada para o diagnóstico e a monitoração de cura pós-terapêutica da infecção crônica pelo *T. cruzi*.

Com relação à natureza molecular do anticorpo secundário (revelador), a metodologia original empregava o anticorpo policlonal anti-IgG total conjugado ao FITC do fabricante BIOLAB<sup>®</sup>, muito utilizado em estudos soro-imunológicos em laboratórios de análises clínicas. Na metodologia modificada foi utilizado como anticorpo secundário anti-Fc de IgG conjugado com FITC do fabricante SIGMA<sup>®</sup>, utilizado preferencialmente em laboratórios de pesquisa. Para uma abordagem sorológica com fins de diagnóstico, a utilização do anticorpo anti-Fc de IgG, pode representar uma alternativa mais adequada considerando a maior especificidade do reagente. Os reagentes anti-Fc de IgG são mais específicos que os reagentes anti-molécula total de IgG, reconhecendo apenas a porção Fc da molécula de imunoglobulina, minimizando a reatividade cruzada com outras imunoglobulinas. Já o anticorpo anti-molécula total de IgG, utilizado na FC-AFEA-IgG original sendo capaz de reconhecer tanto a porção Fc e quanto a fração Fab da molécula de imunoglobulina, favorece a ocorrência de reatividade cruzada com outros anticorpos presente no soro humano, uma vez que as regiões Fab de várias classes de imunoglobulinas podem apresentar homologia estrutural, permitindo o reconhecimento paralelo de IgM, IgA, ou IgE (Abbas 2005). Para solucionar este problema de reconhecimento cruzado, o anticorpo anti-molécula total de IgG empregado na metodologia original deveria ser empregado numa diluição maior, o que resultaria na redução da sensibilidade

da técnica. Na verdade, a diluição empregada na FC-AFEA-IgG original era de 1:2.000 ou 1:3.000, superior à diluição do anti-FC de IgG empregado na metodologia modificada (1:800). Assim, pode ser possível que, a baixa reatividade observada por Vitelli-Avelar e colaboradores (2007) na metodologia original pode estar relacionada à utilização do anticorpo policlonal anti-molécula total de IgG total empregado em diluições muito elevadas para minimizar resultados falso-positivos. Com base nessas evidências, optou-se por trabalhar com o anticorpo anti-Fc de IgG do fabricante SIGMA<sup>®</sup> na metodologia modificada. Adicionalmente, um outro fator a ser considerado é que há uma variação do número de moléculas de fluorocromos por molécula de anticorpo dependendo do fabricante. Fabricantes que trabalham com condições padrões, como é o caso dos anticorpos da SIGMA<sup>®</sup>, nos quais o número de moléculas de fluorocromo por molécula de anticorpo é mais padronizado, há uma maior reprodutibilidade da metodologia além de garantir maior capacidade de detecção do reagente secundário quando a relação fluorocromo/proteína é superior a 2. Uma vantagem é que quando o número de moléculas de fluorocromos/proteína é maior, pode-se trabalhar com diluições mais elevadas dos reagentes secundários, empregando menores volumes de reagentes, o que torna a metodologia exequível com custo menor. Uma outra possibilidade que poderia ainda ser considerada em perspectivas futuras de otimização da metodologia seria a substituição do fluorocromo empregado no reagente secundário por moléculas fluorogênicas mais sensíveis que a fluoresceína. Nesse contexto, vários reativos têm sido disponibilizados comercialmente conjugados a fluorocromos como a ficoeritrina ou a alofococianina que possuem espectro de emissão de fluorescência com mais intensidade relativa que a fluoresceína. Ainda, como proposto por Cordeiro e colaboradores (2001) a possibilidade de se trabalhar com reagentes secundários conjugados com biotina, num sistema de amplificação biotina-streptoavidina-ficoeritrina poderia ser uma alternativa a ser considerada.

Com relação à faixa de diluição das amostras-teste, a metodologia original utilizava oito diluições numa faixa de 1:128 a 1:16.384. É sabido que muitos refinamentos metodológicos são baseados no emprego de amostras

mais diluídas, a fim de reduzir reatividades interferentes. Dessa forma, com o intuito de aumentar a sensibilidade da FC-AFEA-IgG optou-se por ampliar a faixa de diluição dos soros na metodologia modificada, passando a utilizar doze diluições (1:16 a 1:32.768). Uma simulação matemática mostrou que, na metodologia modificada, iniciando a diluição do soro a 1:16, verificou-se que erros de pipetagens de até 5  $\mu\text{L}$  não levam a uma alteração significativa no inverso da diluição do soro na faixa da quinta ou sexta diluição. Já na metodologia original observou-se que erros de apenas 1  $\mu\text{L}$  implicam significativamente na alteração do inverso da diluição do soro. É válido ressaltar que, para solucionar os possíveis erros de pipetagem do soro, poderíamos ter proposto um aumento no volume da amostra pipetada passando, por exemplo, de 3  $\mu\text{L}$  para 400  $\mu\text{L}$  ou de 50  $\mu\text{L}$  para 6.400  $\mu\text{L}$ . Esta alteração na concentração da amostra-teste resolveria da mesma forma o erro embutido no inverso da diluição do soro. Entretanto, quando se observa que o intuito da otimização foi também gerar economia de reagentes, não estaríamos contemplando esta proposta com esse tipo de abordagem. Se pipetássemos 50  $\mu\text{L}$  da amostra, realmente o possível erro de pipetagem estaria sendo minimizado, porém, dependeríamos, para cada diluição da amostra inicial, um volume muito grande de diluente (aproximadamente 6,4 mL). Cabe mencionar que os gastos embutidos com a preparação dos reagentes utilizados na diluição das amostras também devem ser considerados. Na metodologia modificada, prepara-se 400  $\mu\text{L}$  da amostra, implicando numa economia de 16 vezes do diluente empregado. Dessa forma, preparando-se um volume menor de amostra diluída, economiza-se o diluente PBS-3% SFB e, indiretamente, todos os materiais envolvidos na preparação do mesmo.

No contexto da utilização de técnicas sorológicas para fins de triagem em banco de sangue, sabe-se que todas as técnicas utilizam diluições menores, no intuito de aumentar a sensibilidade de detecção dos métodos. Neste contexto, quando a diluição das amostras não é alterada, modifica-se o ponto de corte, para garantir, principalmente, a redução de resultados falso-negativos, garantindo a qualidade do produto a ser oferecido para transfusão (Berrizbeitia 2006, Schmunis 2001).



Com relação à seleção da população de epimastigotas, através da eliminação da interferência de partículas não-relacionadas ('debris'). Na metodologia original a população de interesse era selecionada de acordo com suas características de tamanho e granulosidade. Esse tipo de seleção não discriminava formas epimastigotas de possíveis 'debris' resultantes de parasitos rompidos, fragmentos de fibrina e partículas em suspensão. Porém, a utilização de um corante vital, o azul de Evans, possibilitou segregar a população de parasitos (epimastigotas) de outras partículas que, por não estarem coradas, puderam ser eliminadas através do canal de fluorescência 3 (FL3), não empregado na análise de reatividade que utiliza o canal de fluorescência 1 (FL1), devido à marcação do anticorpo secundário com FITC. Isto não seria possível se a seleção dos parasitos fosse feita apenas em função de parâmetros morfométricos.

Concomitantemente à introdução do azul de Evans na concentração de 100 mg/mL, observamos um fenômeno denominado 'quenching'. Este fenômeno já foi demonstrado por diversos autores e está relacionado com diminuição da intensidade de fluorescência. Segundo a literatura, há uma certa aplicabilidade desse fenômeno em algumas situações, como para reduzir o 'background' durante a análise microscópica na técnica de imunofluorescência, e em alguns protocolos para reduzir autofluorescência celular (Mosiman et al. 1997). Considerando que a citometria de fluxo é uma reação de imunofluorescência em meio líquido, a introdução do corante vital azul de Evans na metodologia modificada para marcação dos parasitos, estaria diretamente relacionada com a redução da fluorescência do fluorocromo FITC, conjugado ao anticorpo secundário (revelador), sendo visível quando analisados os dados através dos histogramas. Apesar do efeito 'quenching', observou-se que a metodologia modificada continuou com reatividade sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas de *T. cruzi* superior quando comparada com a metodologia original, que não utiliza o azul de Evans. Este corante tem sido utilizado há décadas, desde a utilização da técnica IFI para o diagnóstico da doença de Chagas (Camargo 1966), tendo sido observado a sua propriedade de reduzir possíveis interferências

permitindo a visualização mais nítida das formas fixadas de parasitos bem como tornando o campo de análise com maior contraste.

Após as modificações metodológicas, foi avaliado o desempenho da FC-AFEA-IgG modificada aplicada isoladamente ao diagnóstico e à monitoração de cura pós-terapêutica. Na etapa de avaliação do desempenho da metodologia modificada utilizando a curva ROC, cinco diluições apresentaram-se como candidatas (1:512, 1:1.024, 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192) para a utilização no diagnóstico e outras quatro diluições para utilização na monitoração de cura pós-terapêutica específica (1:1.024, 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192), conforme pontos de corte sugeridos pela curva ROC. Entretanto, esse tipo de abordagem estatística apresenta-se inapropriada para aplicação em estudos clínicos onde a reatividade diferencial de amostras individuais deve ser considerada. Assim, foi realizada a análise da reatividade média de amostras individuais de soros, sendo possível identificar as diluições 1:1.024, 1:2.048 e 1:4.096 que apresentaram maior amplitude de segregação entre os grupos NI e CH, além dos melhores índices de desempenho. De forma semelhante, considerando a maior amplitude de segregação, bem como os melhores índices de desempenho, foi possível identificar as diluições 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192 como aquelas que melhor segregaram o grupo TC e TNC. A análise dos índices de desempenho expressos em percentual permitiu a escolha das diluições 1:2.048 e 1:4.096 como possibilidade para aplicação na FC-AFEA-IgG.

Com relação às duas situações clínicas em questão (diagnóstico e tratamento), a metodologia apresentou possibilidades distintas quanto à escolha da diluição a ser utilizada. A busca por uma única diluição que fosse útil para unificar os critérios de interpretação da FC-AFEA-IgG modificada constituiu a nossa próxima meta. A vantagem da unificação da diluição a ser empregada tanto para o diagnóstico como para a monitoração de cura pós-terapêutica, consiste no fato de que, considerando uma área endêmica onde existirão indivíduos tratados-curados da doença de Chagas, quando não se sabe da procedência da amostra, é extremamente importante que se tenha um critério unificado de interpretação da técnica. Quando a procedência da

amostra é conhecida, pode-se mudar o ponto de corte, considerando a situação clínica do paciente, se foi submetido ao tratamento ou não. Unificando os grupos que compunham perfis de reatividade semelhante, observou-se que, dentre as possibilidades fornecidas pela curva ROC, a diluição 1:2.048 e o ponto de corte de PFP = 60% foi selecionado a fim de garantir a sensibilidade e especificidade da metodologia, minimizando as eventuais oscilações de desempenho do método quando aplicado numa amostragem distinta. Este valor de ponto de corte 60% foi confirmado por outra ferramenta estatística denominada TG-ROC (Greiner et al. 1995). Assim, num gráfico que avalia a sensibilidade e especificidade em função dos diferentes pontos de cortes, a TG-ROC estabeleceu o ponto de corte de 60% como o melhor ponto que segregou as populações em estudo. De forma semelhante, a análise do desempenho pela TG-ROC com relação à Razão de Verossimilhança, confirmou-se que esta tem um excelente valor, tendendo ao infinito para valores acima de 89% e abaixo de 29%. Desta forma, a faixa que vai de 55% a 70% corresponderia aos valores de ponto de corte nos quais o teste seria considerado válido.

Adicionalmente, constatou-se um ganho na sensibilidade (1,94%), no valor preditivo negativo (1,5%) e no Índice "J" de Youden (0,2%) na diluição 1:2.048 com relação à diluição de 1:4.096, indicando o melhor desempenho da diluição 1:2.048 na identificação de indivíduos infectados pelo T. cruzi.

Quando analisados os grupos com perfis de reatividade semelhante, os índices de desempenho expressos em percentual demonstrou, na diluição 1:2.048, 97,01% de sensibilidade e 95,4% de especificidade da FC-AFEA-IgG, quando aplicada ao diagnóstico e à monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas. Numa análise comparativa, quando analisado o desempenho da FC-AFEA-IgG modificada isoladamente na segregação dos grupos NI e CH, esta apresentou um melhor desempenho (sens = 98% e esp = 100%) comparado à FC-AFEA-IgG original. Na metodologia otimizada, foi observado um ganho de 16,1% relacionado à sensibilidade, 100% de especificidade, além de oferecer um ganho de 29,4% no índice relacionado ao valor preditivo positivo.

Visando avaliar a aplicabilidade da FC-AFEA-IgG modificada no contexto de triagem em bancos de sangue, foram avaliadas a reatividade das amostras de soros de pacientes portadores de outras doenças infecto-parasitárias e indivíduos não-infectados comparativamente à reatividade de amostras de pacientes portadores de doença de Chagas. Nossos dados revelaram que embora apenas 6,8% (11/162) dos pacientes não-chagásicos, apresentaram valores de PFP > 60%, a técnica ainda apresentou excelentes índices de sensibilidade (98,1%) e especificidade (93,2%), mostrando desempenho superior à outras técnicas sorológicas rotineiramente utilizadas no diagnóstico diferencial da doença de Chagas. Nossos dados revelaram que portadores de LTA e LV foram os principais responsáveis pelos resultados falso-positivos na FC-AFEA-IgG modificada. A reatividade cruzada entre pacientes infectados com tais tripanosomatídeos tem sido freqüentemente relatada em diversos estudos, empregando diferentes metodologias (Camargo & Rebonato 1969, Chiller 1990, Vexenat et al. 1996)

Alguns pesquisadores acreditam que a ocorrência de determinantes antigênicos comuns à diversos tripanossomatídeos como *Leishmania* sp. e *T. cruzi*, poderiam ser responsáveis por tal reatividade cruzada. Por outro lado, outros investigadores salientam a importância da elevada composição de antígenos de carboidrato nas formas epimastigotas de *T. cruzi* como sendo o fator preponderante na reatividade cruzada. Vários estudos demonstram que anticorpos IgG2 e IgG4 ligam-se preferencialmente à epitopos de carboidratos. Estudos de Cordeiro e colaboradores (2001), Rocha e colaboradores (2002) e Lemos e colaboradores (2007), demonstraram que soros de pacientes portadores de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral apresentam níveis elevados de IgG2, que poderiam contribuir para tal reatividade cruzada. Uma possibilidade para minimizar este evento seria a utilização de preparações antigênicas purificadas, o que, entretanto, elevaria os custos operacionais das metodologias. Outra alternativa poderia ser a elaboração de mecanismos de competição seletiva empregando misturas de antígenos de tripanossomatídeos em sistema multiplex.

É interessante salientar que embora até hoje não existam trabalhos que demonstrem de forma sistemática que a leishmaniose visceral pode ser transmitida através de transfusão de sangue, alguns indicadores sugerem que esta via de transmissão pode ocorrer (Luz et al. 1997). Estudos realizados por Palatnik e colaboradores (1995) demonstram que os pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos para leishmaniose visceral, constituem um grupo de risco, pois, segundo os aspectos clínicos e laboratoriais, estes indivíduos não seriam impedidos de ser doadores de sangue. Diversos trabalhos pioneiros mostram que, indivíduos doadores de sangue apresentaram reação sorológica positiva para fucose manose ligante (FML) (FML-ELISA), indicando infecção por *Leishmania* (Otero et al. 2000, Palatnik-de-Souza et al. 1995). Numa outra abordagem, Palatnik-de-Souza e colaboradores (1996) demonstraram a eficácia da transmissão da leishmaniose via transfusão sangüínea em modelo experimental. Neste estudo os autores demonstram que hamsters sadios que receberam sangue de hamsters infectados com *Leishmania* desenvolveram todos os sinais típicos da doença, como ascite, caquexia, além de ser observado alta mortalidade. Esses resultados apontam a possibilidade de transmissão da leishmaniose via transfusão sangüínea, sugerindo um controle epidemiológico mais rígido em bancos de sangue, principalmente em regiões onde a leishmaniose é endêmica. Considerando o exposto, pode-se inferir que embora a FC-AFEA-IgG modificada apresente resultados falso-positivos que poderia limitar sua aplicabilidade em diagnóstico sorológico, sua aplicação em triagens sorológicas em bancos de sangue, esta poderia ser indicada, levando-se em conta algumas considerações, especialmente aquelas inerentes aos aspectos clínicos da LV clássica que limitaria o acesso dos portadores de LV à doação de sangue. Além disso, mesmo considerando a possibilidade de reatividade cruzada com amostras de portadores de LV assintomática, a ocorrência de reatividade cruzada poderia ser relevante por contribuir para o descarte de bolsas de sangue de portadores de LV assintomática minimizando possíveis riscos de transmissão da LV por via transfusional. No intuito de ampliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo no contexto da sorologia de triagem em banco de sangue, permitindo a identificação diferenciada de amostras de soros de

pacientes portadores de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, esse estudo traz como perspectiva e como futuro desafio o estabelecimento de um sistema de detecção "Triplex" aplicado à FC-AFEA-IgG, com utilização isolada de antígenos de *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*, paralela à revelação da reatividade sorológica via anticorpos anti-IgG1. Esta metodologia seria aplicável tanto para triagem em bancos de sangue como para fins de diagnóstico laboratorial.

Em suma, através do presente estudo foi possível estabelecer uma metodologia para a pesquisa de IgG anti-formas epimastigotas de *T. cruzi*. Esta metodologia demonstra, através de seu desempenho, que pode ser um método alternativo para confirmação da doença de Chagas, sendo útil no esclarecimento de casos de sorologia inconclusiva, visto os excelentes índices de desempenho. Em outro contexto, a técnica também é aplicável na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas.

Vale ainda ressaltar que a pesquisa de anticorpos através da citometria de fluxo trata-se de um método de boa reprodutibilidade, com sensibilidade superior aos diferentes protocolos de detecção e revelação convencionais. Entretanto, a utilização da citometria de fluxo em ensaios sorológicos na rotina de um laboratório clínico apresenta ainda custo elevado considerando o alto investimento financeiro para a aquisição e manutenção do citômetro de fluxo, bem como as exigências inerentes ao analista clínico, no âmbito do treinamento e qualificação profissional. Por outro lado, a capacidade da citometria de fluxo de detectar um grande número de parasitos fluorescentes de forma automatizada, fornecendo assim resultados fidedignos e a possibilidade de utilizar parasitos íntegros como fonte de antígeno e não apenas antígeno solúvel, demonstra a relevância dessa metodologia.

## 7 EVIDÊNCIAS

7.1 Ficam estabelecidas alterações metodológicas para a pesquisa sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* (FC-AFEA-IgG), baseada na citometria de fluxo, aplicável em estudos clínicos da doença de Chagas, considerando os melhores índices de desempenho obtidos em relação à metodologia original

Comentário: “Essas alterações metodológicas contribuíram com a otimização da metodologia original, possibilitando discriminar reatividades de IgG do soro de pacientes portadores de doença de Chagas daquelas observadas no soro de indivíduos não-infectados, empregando-se em cada teste: a) anticorpo policlonal anti-Fc de IgG humano conjugado ao FITC; b) a ampliação da faixa de diluição das amostras-teste de 1:16 a 1:32.768; e c) a utilização do corante azul de Evans”.

7.2 A FC-AFEA-IgG modificada, quando aplicada isoladamente no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, requer critérios de interpretação específicos

Comentário: “As diluições do soro 1:1.024, 1:2.048 e 1:4.096 com os pontos de corte de PFP iguais a 26,41%, 12,53% e 8,24%, respectivamente, foram selecionadas com melhor desempenho no diagnóstico. Por outro lado, as diluições do soro 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192, com os pontos de corte de PFP iguais a 12,53%, 8,24% e 2,76%, respectivamente, foram selecionadas com melhor desempenho na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas”.

- 7.3 A utilização simultânea da FC-AFEA-IgG modificada aplicada no diagnóstico e na monitoração de cura pós-terapêutica da doença de Chagas, requer como critério consenso de interpretação dos resultados, a análise da reatividade de IgG anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* na diluição de 1:2.048 e ponto de corte de PFP igual a 60%

Comentário: “Empregando-se a diluição do soro 1:2.048 e o valor de 60% de PFP como ponto de corte, indicado pela TG-ROC, a FC-AFEA-IgG modificada foi capaz de discriminar 97,01% dos pacientes chagásicos (não-tratados ou tratados não-curados) com os valores de PFP restritos à região de alta reatividade ou positivos (PFP>60%), e 95,4% dos indivíduos não-chagásicos (não-infectados ou tratados curados) com os valores de PFP confinados à uma região de baixa reatividade ou negativos (PFP≤60%)”.

- 7.4 O estudo da reatividade sorológica de IgG anti-formas epimastigotas fixadas do *T. cruzi* demonstrou que a FC-AFEA-IgG modificada é capaz de segregar, com excelente desempenho, pacientes chagásicos de indivíduos não-chagásicos, mas portadores de outras doenças infecto-parasitárias

Comentário: “Empregando-se a diluição do soro 1:2.048 e o valor de 60% de PFP como ponto de corte, indicado pela TG-ROC, a FC-AFEA-IgG modificada foi capaz de distinguir 98,1% de pacientes chagásicos (CH) com os valores de PFP restritos a uma região de alta reatividade ou positivos (PFP>60%) e 93,2% de indivíduos não-chagásicos portadores de outras doenças infecto-parasitárias (NCH) com os valores de PFP confinados à região de baixa reatividade ou negativos (PFP≤60%). Destaca-se o fato de pacientes portadores de leishmaniose visceral serem os principais responsáveis pela presença de resultados falso-positivos na FC-AFEA-IgG modificada”.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5º ed. Elsevier; 2005.

Aguirre S, Silber AM, Brito MEF, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS. Design, construction, and evolution of a specific chimeric antigen to diagnose Chagasic infection. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10): 3768-74.

Albuquerque RDR, Fernandes LAR, Funayama GK, Ferriolli-Filho F, Siqueira AF. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1972; 14: 1-5.

Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosil antibodies. *J Immunol* 1991; 146: 2394-96.

Amato-Neto V, Marchi CR, Rossitto ST, Nascimento MS. Avaliação da sensibilidade da diluição 1/20 pela reação de imunofluorescência indireta, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(2):195-8.

American Trypanosomiasis. *Parasites & Health*. Laboratory Identification of parasites of public health concern. Center for Disease Control. Acessado em: 10/06/2007. Disponível em: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Andrade SG. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan; 2000. 177-200.

Andrade ZA. Relatório das Oficinas de trabalho da XVI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e IV Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses (Relatório de Reunião). *Rev Soc Bras Med Trop* 2000a; 33: 619-23.

Andrade ZA. Patologia da doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan; 2000b. p. 201-230.

Avila HA, Borges-Pereira J, Thiemann AO, De Paiva E, Degrave W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clinical Microbiol* 1993; 31: 2421-26.

Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Ache A, Lacouture S, Medina M, Ward BJ. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus Med* 2006; 16(6): 419-31.

Bittar JFF. Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético RAP-1 de *Babesia bovis*: Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Bogh LD, Duling TA. Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. *Clinical Laboratory Science* 1993; 6: 3.

Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1973; 5: 220-4.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 1973; 27: 347-82.

Brener Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (Orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 379-88.

Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitol* 1995; 110: 241-47.

Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V, Fernandes O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina*. 1999. 59 p.

Browner WS, Newman TB, Cummings SR. Designing a new study. III Diagnostic Tests. In: Hulley SB, Cummings SR. *Designing clinical research*. Baltimore, Williams e Wilkins; 1998.

Brumpt E. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à Tripanossomose de Chagas. *An Paul Med Cirurg* 1914; 3: 97-102.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; 6: 6-93.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1966; 8: 227-34.

Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18(4): 500-5.

Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Correa NS, Peres BA. Hemagglutination test for Chagas disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Rev Inst med Trop S Paulo* 1971; 13: 45-50.

Cançado JR. Criteria of Chagas Disease Cure. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 (supl II): 331-35.

Castro CN, Macedo V, Prata A. Comportamento da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 anos. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(2): 157-65.

Castro CN, Prata A, Macedo V. Estudo clínico durante 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambai, Goiás, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34(4): 309-18.

Castro CN, Prata A, Mauro SVM. Influência da parasitemia na evolução da doença de Chagas crônica. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(1): 01-06.

Chagas C. Nova Tripanosomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1: 159-218.

Cerisola JA, Chaben MF, Lazzari JO. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prens Med Arg 1962; 49:1761-7.

Chiari E, Dias JCP. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Soc Bras Med Trop 1975; 9: 133-6.

Chiari E, Dias JCP, de Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnostic of human chronic Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop 1989; 22: 19-23.

Chiari E. Diagnostic test for Chagas disease. In: Chagas disease - American Trypanosomiasis: Its impact on transfusional and clinical medicine. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. (eds). ISBT Brasil. 1992. p.153-64.

Chiari E, Galvão LMC. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR (orgs). Clínica e Terapêutica da doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1997. p. 85-98.

Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(6): 650-6.

Coelho-dos-Reis JG, Rocha RD, Brito-Melo GE, Ribas JG, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Barbosa-Stancioli EF, Martins-Filho OA. Evaluation of the performance of immunological parameters as indicators for clinical progression of chronic HTLV-1 infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1): 29-36.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(Supl III): 3-29.

Cordeiro FD. Análise da reatividade de IgG anti *Trypanosoma cruzi* em soros de pacientes chagásicos crônicos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, mestrado em biologia celular e molecular. 2000.

Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Rocha MOC, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas Disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8(1): 112-18.

Costa J, Argolo AM, Felix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 2006; 1385: 47–52.

Costa J, Felix M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1): 87-90.

de Andrade RA, Reis AB, Gontijo CM, Braga LB, Rocha RD, Araújo MS, Vianna LR, Martins-Filho OA. Clinical value of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116(1-2): 85-97.

Dias E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1934; 28(1): 1-110.

Dias JCP. Técnica de xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1940; 35: 335-42.

Dias JCP. Controle de vetores da doença de Chagas do Brasil e riscos de reinvasão domiciliar por vetores secundários. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 387-91.

Dias JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de saúde Pública* 2006a; 22(10): 2020-21.

Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Inst Med Trop* 2006b; 39(4): 370-375.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas Disease in Latin América - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 7(5): 603-12.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). II Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-35.

Fernandes AJ, Vitor RWA, Dias JCP. Avaliação parasitológica e sorológica de caprinos inoculados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* 1994; 36(1): 11-17.

Ferreira AW, Avila SLM. Doença da Chagas. In: Ferreira AW, Avila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 241-9.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 755-9.

Fleiss JL. An introduction to applied probability. In: Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley & Sons; 1981. p.1-18.

Fletcher RH, Fleter SW, Wagner EH. Diagnóstico. In: Fletcher RH, Fleter SW, Wagner EH. Epidemiologia clínica: bases científicas de conduta médica. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas 1989; p. 68-108.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública* 1980; 14: 265-99.

Forero D, Weirauch C, Baena M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 2004; 670: 1–12.

Gadelha AA. Avaliação do desempenho do "Kit" EIE-Recombinante- Chagas-Biomanguinhos frente ao ELISA convencional e o Teste de hemaglutinação Indireta. [Dissertação]. Departamento de Saúde Coletiva do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/MS-Recife. 60 p. 2003.

Gadelha AA, Vercosa AF, Lorena VM, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WW, Ferreira AG, Silva ED, Krieger MA, Goldenberg S, Gomes YM. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with convencional ELISA and the haemagglutination test. *Vox Sang* 2003; 85(3): 165-70.

Galvão C, Ângulo VM. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colômbia. *Zootaxa* 2006; 1241: 61–8.

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 2003; 202: 1-36.

Galvão LMC, Nunes RMB, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibodies titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 220-3.

Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 1991; 7: 240-4.

Goldenberg S, Krieger MA, Lafaille JJ, Almeida E, Oelemann W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 53: 71-6.

Golgher D & Gazzinelli RT. Innate and Acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 2004; 37 (5): 399-409.

Gomes YM, Diagnóstico etiológico. In: *Doença de Chagas*. Malta J, (org). Rio de Janeiro: Sarvier; 1996. p. 119-32.

Gomes YM. PCR and sero-diagnosis in chronic Chagas' disease: biotechnological advances. *Appl Bioc Biotec* 1997; 66: 107-19.

Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Med Hyg* 1999; 60(2): 205-10.



Gontijo ED, Galvão LMC, Eloi-Santos SM. Chagas disease: Criteria of cure and prognosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(supl I): 357-62.

Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Met* 1995; 185: 123-32.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 45: 23-41.

Greiner PF, Maywski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures: principles and applications. *Ann Intern Med* 1981; 94: 557-92.

Guevara AG, Taibi A, Alava J, Guderian RH, Ouassi A. Use of a recombinant *Trypanosoma cruzi* protein antigen to cure of Chagas disease. *Trans R Soc Med Hyg* 1995; 89: 447-48.

Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. User's guides to the medical literature. III How to use an article about a diagnosis test. Are the results of the study valid? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994; 271: 389-91.

Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of Flow cytometry. *Mol Biotechnol* 1999; 11: 37-53.

Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Rev Microb* 1995; 21(2): 123-52.

Krautz GM, Coutinho MG, Galvão LMC, Cançado JR, Krettli AU. Soluble antigens released by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes used in ELISA to detect cure in chagasic patients following specific treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27: 199-207.

Krettli AU, Cançado IR, Brener Z. Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy, recent advances. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 157-64.

Lauricella MA, Castañera MB, Gürtler RE, Segura EL. Immunodiagnosis of Trypanosoma cruzi (Chagas Disease) Infection in Naturally Infected Dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(4): 501-507.

Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Pissinate JF, Martins-Filho OA, Dietz R. Detection of Leishmania (Leishmania) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol 2007; 14 (5): 569-76.

Lorca M, Child R, Garcia A, Silva M, Martinez L, Jerez G, Toledo I, Mazzano D. Evaluation of commercial kits used for Chagas' disease diagnosis in blood banks in Chile. II. Routine Application. Rev Med Chil 1994; 122: 925-31.

Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Trypanosoma cruzi. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (orgs). Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 344-78.

Luz KG, da Silva VO, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, Freire TC, d'Almeida JB, Palatnik M, Palatnik-de Sousa CB. Prevalence of anti-Leishmania donovani antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. Am J Trop Med Hyg 1997; 57(2):168-71.

Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: Técnica sensível na detecção do Trypanosoma cruzi em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27: 143-8.

Maekelt GA. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13: 11-15.

Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol Inst Invest Sal Des* 2007; 3(1): 1-11.

Martins MA. Estudo da resposta imune celular desencadeada pela vacina anti-amarílica 17DD [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Mestrado em Bioquímica e Imunologia. 2004.

Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado J, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in Human Chagas' disease. *Clin Diag Lab Immunol* 1995; 2(5): 569-73.

Martins-Filho AO, Eloi-Santos SM, Carvalho AT, Correa-Oliveira R, Rassi A, Luquetti AO, Rassi GG, Brener Z. Double-blind study to evaluate flow cytometry analysis of anti-live trypomastigote antibodies for monitoring treatment efficacy in cases of human chagas disease. *Clinical and Diagnostic Lab Immunol* 2002; 9(5): 1107-13.

Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi E. Transmisión del *Schizotripanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA* 1936; 28: 41-49.

Meira WSF, Galvão LMC, Gontijo ED, Machado-Coelho GLL, Norris KA, Chiari E. Use of *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2) 707-712.

Metz C. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 1978; 8(4): 283-98.

Moreira SM. Eritiquiose monocítica canina experimental: avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos, antes e após cloridrato de tetraciclina [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.

Moreno AR, Carcavallo RU. Enfoque ecológico da epidemiologia da doença de Chagas. p. 981–1016. In: Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H. (org.). Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 1999; v. III. 1217 p.

Moser DR, Kirchof LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1477-82.

Mosiman VL, Patterson BK, Canterero L, Goolsby CL. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method cytometry. *Clin Cytom* 1997; 30: 151-6.

Mourão OG, Mello OC. Hemocultura para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1975; 9: 183-8.

Mullis KB, Faloona FA. Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 335-50.

Nakazawa N, Rosa D, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MNS, Abath FGC, Gomes YM. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1024-27.

Norris KA, Galvão LMC, Schrimpf JE, Cançado JR, Krettli AU. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitological clearance in human Chagas disease. *Infect Immun* 1994; 61: 4072-74.

Oelemann WM, Teixeira MD, Verissimo da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, Peralta JM. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2423-7.

Otero AC, da Silva VO, Luz KG, Palatnik M, Pirmez C, Fernandes O, Palatnik de Sousa CB. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(1):128-31.

Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, de Souza EP, dos Santos WR, de Macedo SR, de Medeiros LV, Luz K. The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*. a new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29(2): 153-63.

Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, de Souza EP, Palatnik M, Luz K, Borojevic R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(4): 390-3.

Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM Jr, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4): 971-4.

Picka MC, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(2): 226-33.

Portela-Lindoso AAB & Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública* 2003; 37(1): 107-15.

Prata A. Classification of Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(1): 37-42. Errata: Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(4): 246.

Rezende JM, Rassi A. Doença de Chagas. In: Castro LP, Cunha AS, Rezende JM. Protozooses Humanas. São Paulo: Fundo Editorial Byk 1994; p. 38-77.

Rocha RDR, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Correa-Oliveira R, Marques MJ, Genaro O, Mayrink W, Martins-Filho OA. Anticorpos anti-promastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados por citometria de fluxo, para identificação de leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35(6): 551-62.

Rocha RDR. Aplicações da pesquisa de IgG anti-formas promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*, por citometria de fluxo, em estudos clínicos da leishmaniose cutânea localizada [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Diagnosis. In: Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine. Boston: Litle, Brown and Company; 1991. p.9-170.

Sáez-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas disease. Vox Sang 1998; 74: 228-31.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1995; 230: 1350-4.

Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 2007; 1443: 55-64.

Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone Programme against Chagas Disease. *Adv Parasitol* 1999; 42: 1-25.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas Disease Control. *Trends of Parasitol* 2006; 22(12): 583-88.

Schmunis GA. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin América. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Suppl I): 93-101.

Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Benne D. Risk for Transfusion-Transmitted Infectious Diseases in Central and South América. *Em Infect Diseases* 1998; 4(1).

Schmunis GA, Zicker F, Cruz JR, Cuchi P. Safety Of Blood Supply For Infectious Diseases in Latin American Countries, 1994–1997. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(6) 924–30.

Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the Blood Supply in Latin América. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(1): 12–29.

Sherlock IA. Vetores. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (orgs). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 21-40.

Silva ML. Padrão de citocinas intracelulares em leucócitos circulantes de voluntários primovacinados com a vacina contra a febre amarela 17DD [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Mestrado em Patologia Geral; 2005.

Silveira AC. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. In: Silveira AC. *El Control de la Enfermedad de Chagas en los Países del Cone Sur de América*. História de una Iniciativa Internacional, 1991/2001. Brasília: Opas; 2002. p. 15-43.

Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang* 2004; 87(3): 204-7.

Steindel M, Grisard EC. *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi*. In: De Carli GA. (org.). *Parasitologia Clínica. Seleção e Uso de Métodos e Técnicas de Laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. Rio de Janeiro, RJ - Brasil: Atheneu, 2001. p. 313-324.

Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmanna C, Sincero TCM, Stoco PH, Murta SMF, Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(1): 25-32.

Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; 240(4857): 1285-93.

Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Peralta J. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Patol Clin* 1994; 30: 133-9.

Tobler LH, Contestable P, Pitina L, Groth H, Shaffer S, Blackburn GR, Warren H, Lee SR, Busch MP. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. *Transfusion* 2007; 47(1): 90-6. Erratum in: *Transfusion* 2007; 47(3):554.

Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, Franco da Silveira J. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1554-60.

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*,



Leishmania chagasi and Leishmania (Viannia) braziliensis. Rev Inst Med Trop S Paulo 1996; 38(3): 177-85.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública 2000; 16(2): 7-12.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Teixeira CA, Évelin MN, Dias JCP, Rassi A, Luquetti AO, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G in the clinical laboratory. J Immunol Met 2007; 318 (1-2): 102-12.

Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease. Lancet 1975; 1: 426-29.

Youden J. Index for rating diagnostic tests. Cancer 1950; 3(1): 32-5.

Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: ISBT Brazil' 92. 1997.

Zarate-Blades CR, Blades N, Nascimento MS, da Silveira JF, Umezawa ES. Diagnostic performance of tests based on Trypanosoma cruzi excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(2): 229-32.

Zweig MH, Campbell G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine (Review). Clin Chem 1993; 39: 561-77.